Evaluation des effets biostimulants de la Glutacétine et de ses dérivés sur l'efficience d'usage de l'azote, le rendement et la qualité grainière du blé tendre : criblage en serre, validation au champ et développement d'outils de diagnostic

Victor Maignan

▶ **To cite this version:**

Victor Maignan. Evaluation des effets biostimulants de la Glutacétine et de ses dérivés sur l'efficience d'usage de l'azote, le rendement et la qualité grainière du blé tendre : criblage en serre, validation au champ et développement d'outils de diagnostic. Sciences agricoles. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC230 . tel-03520736

HAL Id: tel-03520736
https://theses.hal.science/tel-03520736

Submitted on 11 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Evaluation des effets biostimulants de la Glutacétine et de ses dérivés sur l'efficience d'usage de l'azote, le rendement et la qualité grainière du blé tendre : criblage en serre, validation au champ et développement d'outils de diagnostic

Présentée et soutenue par
VICTOR MAIGNAN

Thèse soutenue le 18/06/2021 devant le jury composé de		
M. PATRICK DU JARDIN	Professeur, Gembloux Agro-Bio Tech Université Liège	Rapporteur du jury
M. JACQUES LE GOUIS	Directeur de recherche, INRAE	Rapporteur du jury
M. VINCENT ALLARD	Chargé de recherche, INRAE	Membre du jury
MME ISABELLE BOULOGNE	Maître de conférences HDR, Université Rouen Normandie	Membre du jury
MME MARIE-PASCALE PRUD'HOMME	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
M. JEAN-CHRISTOPHE AVICE	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par JEAN-CHRISTOPHE AVICE, Écophysiologie végétale, agronomie et nutritions N.C.S. (Caen)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N,C,S

Remerciements

Trois ans, voilà la durée d'une thèse. C'est à la fois court et long. Fastidieux et palpitant. Epuisant et stimulant. Pour autant, le mot qui décrit peut-être le mieux cette expérience, c'est « enrichissant ». On enrichit évidemment ses connaissances et ses compétences, mais le plus important est probablement l'enrichissement humain. Ces trois années m'ont permis de découvrir un nouveau monde et de nouvelles personnes. C'est à toutes ces personnes, qui ont été là, de près ou de loin, que j'adresse ces quelques mots.

Tout d'abord, je tiens à remercier **Marie-Pascale Prud'homme**, la directrice du laboratoire UMR 950 INRAE – Université de Caen EVA, pour son accueil au sein du laboratoire durant ces trois années, pour ta confiance en moi (jeune étudiant utopique que tu ne connaissais absolument pas), et pour tous ces moments de partage conviviaux. Je suis certain que la présence de fructanes chez le blé n'y est pas pour rien dans mon acceptation au labo. Merci bien sûr aussi à **Philippe Laîné**, directeur adjoint du laboratoire, pour cet accueil et tous nos dialogues sur l'avancée des cultures au champ. En lisant ce manuscrit, tu pourras te réconforter en comprenant que les terres ornaises ne sont pas toujours les pires ! Et que les biostimulants peuvent leur donner un coup de main, mais je crois que ça tu le sais déjà. Ma grande déception aura été le refus de mon fabuleux miroir convexe, un investissement qui aurait changé ma vie de doctorant mais M. le directeur n'aura jamais voulu...

Ensuite, je suis très honoré de la présence de l'ensemble des membres de mon jury de thèse. Un immense merci à **Patrick du Jardin** et **Jacques Le Gouis** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je suis également très heureux que **Vincent Allard, Isabelle Boulogne** et **Marie-Pascale Prud'homme** aient accepté d'être les examinateurs de ce travail de thèse, et les remercie sincèrement. Je n'oublie absolument pas la présence de **Baptise Soenen** en tant que membre invité : merci beaucoup pour ce « oui » si spontané, comme celui de tous les autres membres de ce jury d'ailleurs !

Je continue ces remerciements avec l'Association Nationale de la Recherche de la Technologie (ANRT) pour le financement de cette thèse CIFRE, et la Région Normandie et le FEADER pour le financement du projet FIELD-Prot. C'est grâce au soutien de ces financeurs que cette thèse a pu voir le jour tant en serre qu'aux quatre coins de la Normandie et en allant jusqu'à Barcelone. Concernant le congrès de Barcelone, je suis reconnaissant envers l'école

doctorale NBISE pour son aide financière qui a permis ce voyage. Si vous saviez comment l'Espagne, ses tapas et ses churros con chocolate me manquent…

Mes remerciements s'adressent maintenant à **Jean-Christophe Avice**, mon directeur de thèse : un seul mot ne suffit pas pour décrire le personnage. Allez, je m'y risque : incroyable ! Incroyable la pédagogie que vous avez en cours (et oui, je m'en souviens comme si c'était hier !), incroyable de croire en chaque personne (et même en un étudiant que vous connaissiez à peine), incroyable l'autonomie que vous m'avez laissée pour mener à bien ce projet de thèse, incroyable la pertinence de vos suggestions pour faire progresser les choses, incroyable votre humanité… Bref je m'arrête là car il faudrait une thèse pour avoir le temps de tout dire sur vous. Oui « vous », j'arriverai peut-être bientôt à vous tutoyer ! Merci infiniment de m'avoir fait confiance dès le départ, d'avoir cru en moi et au projet Via Végétale : sans vous, ce projet n'aurait jamais existé. Je vous exprime ici ma reconnaissance pour tout le temps que vous avez consacré à ce projet de thèse malgré votre emploi du temps souvent trop chargé. La bonne humeur, la rigueur scientifique, la patience et l'efficacité semblent être les bons mots clés pour résumer notre collaboration pour ce projet de thèse. Je crois par ailleurs que vous m'avez transmis le virus de la recherche ; fort heureusement, celui-ci n'a aucun risque mis à part de devoir se recroiser régulièrement ces prochaines années (et c'est tant mieux !). Je garde en tête d'innombrables souvenirs : changer une roue crevée sur l'autoroute, vos visioconférences en plein champ, les cervezas et le jamón de Barcelone… et j'espère que l'on réussira à en créer bien d'autres.

Une autre personne sans qui ce travail n'aurait jamais existé est **Patrick Géliot**. Quand je repense à mes premiers mails depuis Córdoba et la galère pour obtenir ce premier stage chez Via Végétale, et que je vois le résultat aujourd'hui, je me dis que ça valait quand même la peine d'insister auprès de ce prof et sa poudre de perlimpinpin (c'est exactement comme cela qu'il avait nommé les produits Via Végétale…). Ce premier stage a finalement été une révélation à plusieurs niveaux : (1) ce n'était pas de la poudre de perlimpinpin (ouf !), (2) on ne connaissait pas grand de cette formulation tout de même, (3) le feeling était là et nous avions des convictions communes. Il n'en fallait pas plus pour que je crois naïvement que monter un projet de thèse était possible. Et on l'a fait ! Alors merci beaucoup pour toute cette confiance que vous m'accordez depuis plus de cinq déjà. Grâce à cette confiance mutuelle, nous avons construit, nous construisons et j'espère que nous construirons encore longtemps

ce beau projet d'entreprise. Je me dois d'associer maintenant **Xavier Roulleau** à ce beau projet : tu nous as rejoint en cours de route mais ton implication scientifique et ta vision du monde agricole m'apporte déjà beaucoup. Alors merci beaucoup pour tout ça et j'ai hâte de voir notre avenir commun. Je remercie au passage tous mes collègues du groupe Teraxion et en particulier Xavier Bonnet et Emmanuel Pedalino qui se sont « amusés » à compter des grains de blé. La page qui s'ouvre devrait nous permettre de bien mieux nous connaitre et j'en suis ravi !

Je n'oublie pas par ailleurs les experts qui ont contribué à la réussite de ce projet de thèse. En premier lieu, les membres de mon comité de pilotage, Vincent Allard, Sophie Génermont et Baptiste Soenen, qui m'ont tous les trois apportés de précieux conseils sur les différentes expérimentations. Je remercie également les membres de mon CSI, Ludovic Galas, Thierry Tétu, Thierry Lamaze et Bastien Bourdon pour les conseils avisés sur les aspects administratifs, expérimentaux, de formations et de gestion du projet. Mes remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes ayant participé au projet FIELD-Prot. Pierre-Vincent Protin et Régis Vecrin, un grand merci d'avoir cru en ce projet alors que l'on ne se connaissait pas, j'espère sincèrement que c'était uniquement le début d'une collaboration longue et fructueuse pour nous tous. Merci aussi Frédéric Cardon ainsi qu'à tous les techniciens de la Chambre d'Agriculture qui ont été impliqués dans ce projet. Enfin, je te remercie vivement **Raphaël Coquerel** pour tous les travaux effectués durant ce projet, ces allers-retours sur les parcelles avec tous tes outils et tout ce travail sur R (ma plus grande passion…) ! J'en profite pour dire merci aux différents spécialistes du NIRS ; Pierre Roumet, Martin Ecarnot (pour votre accueil montpelliérain bref mais chaleureux) et le local de l'étape Philippe D'Hooghe (toujours un vrai plaisir de travailler avec toi !).

Ces remerciements valent aussi bien sûr pour toutes les personnes du laboratoire EVA, cette belle équipe qui travaille le plus souvent dans la bonne humeur. Avec vous, c'est un vrai plaisir de venir au laboratoire, de partager un café, de tenter de faire des mots croisés ou de piquer le journal de JB (JB, ne réponds pas, c'est encore Victor qui taquine !). Ce JB a quand même de belles idées ; en plus de ramener le journal tous les jours, tes ateliers doctorants sont un lieu d'échanges constructifs qui permettent à chacun de bien s'approprier son sujet de thèse tout en permettant de bien connaitre le sujet de tous. Continue et transmets bien ce concept, ça serait dommage de l'emmener avec toi à la retraite. Maintenant que j'ai embêté

JB, je peux remercier tout le monde ! Peut-être en premier lieu Anne-Françoise pour toute ton implication et tout ton dévouement pour nos cultures. Tu as finalement réussi à me dompter, j'ai fini par bien tout noter sur la feuille de suivi de culture et par bien tout nettoyer selon le protocole. Merci beaucoup, car c'est grâce à ta rigueur, ton professionnalisme et ta passion que nous réussissons à avoir de belles cultures. Maintenant, c'est plus risqué mais je vais essayer d'oublier personne, un énorme merci à tous ceux qui ont participé un peu, beaucoup, passionnément voire à la folie à toutes mes récoltes pendant cette thèse : Patrick, Josiane, Magali, Anne-Françoise, Jean-Christophe, Olivier et Raphaël. Fastidieux mais indispensables, je remercie également Magali, Josiane et Bénédicte pour les nombreux broyages malgré le fil à retorde que le blé a pu vous donner (et la bonne odeur de sa farine en contrepartie). Je tiens également à adresser ces remerciements à l'équipe PLATIN', Jéhane, Fanny, Frédérine, Josette et plus récemment Gwenaëlle et Quentin pour toutes ces analyses IRMS et ICP-MS-HR et vos retours favorables à toutes mes demandes (parfois farfelues). Mes acolytes de la plateforme Proteogen, Benoit et Julien, m'ont également beaucoup aidé ; je vous remercie donc très sincèrement les gars. Benoit pour toute ta disponibilité pour m'expliquer ta machine et analyser mes données, et Julien pour le café et toutes ces balles échangées. Ces discussions de ping autour d'un café resteront toujours d'excellents moments pour moi : faites couler le café, je reviens bientôt ! Si l'on revient au labo, je ne peux pas oublier Sophie Vogel : merci 1000 fois pour avoir été indulgente avec moi concernant l'administratif, et promis, j'essaie de penser à envoyer une carte postale lors de mon prochain voyage. Et Julie, ahhh sacrée Julie, tu n'auras pas été très utile sur le plan scientifique de ma thèse mais quelle efficacité sur le plan humoristique. Enfin, merci à tous les autres, Sophie B-M, Phillipe E., Frédérik, Alain, Jacques, J-B, Sylvain, Servane, Lucie, Valentin, Jean-François, Emma, Frédéric, Annette et Nathalie, pour toutes ces discussions, scientifiques ou non, qui m'auront quoiqu'il en soit fait progresser sur les plans personnels et professionnels. Mention spéciale à Servane (madame stats, j'ai mieux compris ce monde spécial grâce à toi !), Frédérik (tes caricatures me feront toujours rires, et encore merci pour celle sur ma thèse même si tu ne la valides pas vraiment) et Jacques (monsieur informatique, tu m'as bien aidé sur de nombreux sujets numériques).

Entrons maintenant dans le bureau des doctorants, j'y ai passé quelques mois avec les anciens, Cylia, Émilie et Maxence : c'était court mais très sympathique ! Aurélia s'incrustait souvent d'ailleurs, et ne parlons pas d'Antoine qui s'est carrément installé… Et on a vite

compris pourquoi, hein Galatéa ? Plein de bonheur à vous ! Non en fait, tu préparais depuis longtemps un projet de thèse en cachette et il est en train d'éclore, je te souhaite donc de rester trois ans de plus dans ce bureau. Dommage que Hanh ne soit plus dans ces murs, j'adorais suivre vos aventures ! Puis Charlotte et Moha et vos va-et-vient entre Caen et Rouen, allez dites-le nous franchement, on est mieux à Caen ! Je n'oublie pas Hans, discret et toujours bienveillant. Enfin mes voisins du bureau, Aurélien et Lethicia, deux personnes que j'apprécie aussi très sincèrement ; un point commun ? Le numérique, le premier en est passionné et c'est passionnant de l'écouter, la deuxième s'y met progressivement à cause de la petite Sophie (j'espère que SuMoToRi devient ton ami !). Et bon courage à Jérémy le petit dernier ! Ce fameux virus aura limité nos relations, pourtant nous avions là une bien belle équipe diversifiée et cosmopolite.

Enfin, je voudrais remercier ici tous mes proches. Tout d'abord, mes grands-parents car c'est vous qui m'avez fait découvrir l'agriculture. Je me vois encore dire lors d'une audition pour une thèse « d'un côté mes grands-parents maternels m'ont fait découvrir l'élevage au cœur du Pays d'Auge, et de l'autre mes grands-parents paternels m'ont appris beaucoup sur les cultures de la plaine de Caen ». C'est donc parce que vous m'avez transmis vos nombreuses connaissances que je suis aujourd'hui passionné d'agronomie (et probablement aussi grâce à Thomas et notre enfance dans les prairies et les stabules). Un immense merci aussi à mes parents d'avoir toujours cru en moi. C'est grâce à vous que tout cela est possible aujourd'hui ; j'aurais pu simplement faire un BTS, mais comme dirait papa, vous avez investi sur moi en m'incitant à aller en école d'ingénieurs. J'ai vécu de formidables moments durant ces années qui ont façonné ce que je suis aujourd'hui. Travailler dans plusieurs fermes en France, découvrir l'apiculture et la recherche au Canada, vivre en Espagne plusieurs mois… Toutes ces expériences font entièrement parties de ma personnalité maintenant, et c'est grâce à vous ! Et puis, surtout, merci de supporter ce caractère que vous avez forgé et ma mauvaise humeur parfois (souvenez-vous des quelques mois d'avant thèse). Bref, merci d'être là et d'être vous. Je n'oublie bien évidemment pas les côtés qui font que la vie est encore plus belle et qui participent à mon épanouissement quotidien : le sport, la nature et la nourriture. Alors je remercie tous ces gens qui partagent avec moi ces moments, Arnaud, Damien et Julien (en espérant que l'on puisse rejouer ensemble au ping), Laurent, Thomas et tous les autres pour tous ces dimanches à la campagne et Alex, mon chef cuisinier-pâtissier qui adore le bon gras

mais n'en mange que trop rarement à mon goût. Je ne peux pas non plus oublier mes Lou, ce qui ont partagé ma vie pendant cette thèse. Merci infiniment My Loute pour tout ton soutien pendant ces trois années avec ses hauts et ses bas, tu es toujours là pour m'encourager afin que je puisse donner le meilleur de moi-même (comme dirait une autrice bien connue : + = +). Un nouveau chapitre inconnu et excitant s'ouvre et nous emmènera dans une vie que l'on se prête à rêver aujourd'hui. Mon Gros Lou fera évidemment parti de cette vie. Ce petit chat est un compagnon fort agréable pendant les périodes de télétravail : il donne vie à la pièce grâce à (ou à cause de…) ses bêtises ou ses câlins mais heureusement il dort souvent et il est trop mignon. Nous préparons l'avenir en regardant dans la même direction. Hier, la vie nous a réuni, demain le destin nous emmènera assurément vers du positif.

Liste des abréviations

°CJ : Degrés-jour

A

AA : Acide aminé, amino acid
ABA : Acide abscissique, abscisic acid
ACN : Acétonitrile
ADN : Acide désoxyribonucléique
AMM : Autorisation de mise sur le marché
ANOVA : Analyse de la variance
ANRT : Association nationale de la recherche et de la technologie
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
APC : Article processing charge
AS : Asparagine synthétase
ATP : Adénosine triphosphate

B

B : Bore
BBCH : Echelle des stades de croissance (*Biologische **B**undesanstalt, **B**undessortenamt und **CH**emische Industrie)*
BR : Brassinostéroïdes

C

C : Carbone, carbon
Ca : Calcium
Cd : Cadmium
CE : Conformité européenne
cHATS : HATS constitutif
CIFRE : Convention industrielle de formation par la recherche
CKs : Cytokinines
Cl : Chlore
Co : Cobalt
CO_2 : Dioxyde de carbone
COMIFER : Comité français d'étude et de développement de la fertilisation raisonnée
CRF : Controlled-release fertilizers (ou fertilisant à libération contrôlée)
Cu : Cuivre
Cys : Cystéine

D

DCD : Dicyandiamide
DMPP : 3,4-dimethypyrazole phosphate
DMPSA : 3,4-dimethylpyrazole succinic acid
DNA : Acide désoxyribonucléique (ADN), deoxyribonucleic acid
DW : Poids sec, dry weight

E

EA : Elementary analyzer
EAA : Efficience d'assimilation de l'azote (ou Nitrogen assimilation efficiency, NAE)
EAbA : Efficience d'absorption de l'azote (ou Nitrogen uptake efficiency, NUpE)
EEF : Enhanced-efficiency fertilizers (ou fertilisant à efficience améliorée)
EMSC : Extended multiplicative scatter correction
eqCO_2 : Equivalent CO_2
ERA : Efficience de remobilisation de l'azote (ou Nitrogen remobilization efficiency, NRE)
ET : Ethylène
EU : Union européenne, European union
EUA : Efficience d'usage de l'azote (ou Nitrogen use efficiency, NUE)
EUtA : Efficience d'utilisation de l'azote (ou Nitrogen utilization efficiency, NUtE)
EVA : Ecophysiologie végétale et agronomie

F

F : Forme d'engrais
FDR : False discovery rate

Fe : Fer
FEADER : Fonds européen agricole pour le développement rural
FIELD-Prot : Projet de recherche PEI-AGRI-FEADER sur le développement de fertilisants innovants pour l'amélioration du bilan environnemental et des performances agronomiques (rendement et qualité protéique) chez le blé
FLC : Flowering locus C
FT : Flowering locus T

G

GAs : Gibbérellines
GDH : Glutamate déshydrogénase
GES : Gaz à effet de serre (ou greenhouse gas, GHG)
GIEC : Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat
GO : Gene ontology
GOGAT : Glutamine oxoglutarate aminotransferase
GPD : Grain protein deviation, écart à la relation teneur en protéines-rendement en grains
GS1, GS2 : Glutamine synthétase 1 ou 2
GS : Stade de croissance, growth stage
GSP : Grain storage protein
GST : Glutathione S-transférase

H

HATS : High affinity transport (ou transport à haute affinité)
HI : Harvest index (ou indice de récolte)
HMW : High molecular weight
HMW-GS : High molecular weight glutenin subunit
HR ICP-MS : Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif haute résolution

I

IAA : Acide indole-3-acétique (ou auxine)
ICORE : Interactions cellules organismes environnement (structure fédérative)
iHATS : HATS inductif
INCCA : Interactions nutritionnelles, conduites et contraintes abiotiques
INN : Indice de nutrition azotée
INRAE : Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
IRMS : Spectrométrie de masse à rapport isotopique
IWGSC : International wheat genome sequencing consortium

J

JA : Acide jasmonique
JAF : Jour après floraison

K

K : Potassium
kDa : Kilo Dalton

L

LATS : Low affinity transport (ou transport à basse affinité)
LC : Chromatographie liquide, liquid chromatography
LFQ : Label-free quantification
LMW : Low molecular weight
LMWG : Low molecular weight gliadin
LMW-GS : Low molecular weight glutenin subunit
Lys : Lysine

M

MeJA : Méthyl-jasmonate
Met : Méthionine

MFSC : Matières fertilisantes et supports de culture
Mg : Magnésium
MIP : Protéine intrinsèque majeure
Mn : Manganèse
Mo : Molybdène
MS : Matière sèche
MS : Spectrométrie de masse, mass spectrometry
MSC : Multiplicative scatter correction
Mt : Million de tonnes

N

N : Azote, Nitrogen
N_2 : Diazote
N_2O : Protoxyde d'azote
Na : Sodium
NAM : No apical meristem
NBI : Nitrogen balance index
NBPT : N-(n-butyl) thiophosphoric triamide
NCBI : National center for biotechnology information
NDRE : Normalized difference red edge
NDVI : Normalized difference vegetation index
NH_3 : Ammoniac
NH_4^+ : Ammonium
NHI : Indice de récolte en azote, Nitrogen harvest index
Ni : Nickel
NIP : Protéine intrinsèque membranaire noduline-26-like
NIR : Near-infrared
NiR : Nitrite réductase
NIRS : Spectroscopie proche infrarouge, Near-infrared spectrocopy
NO : Oxyde d'azote
NO_2^- : Nitrite
NO_3^- : Nitrate
NPPT : N-(n-propyl)-thiophosphoric-triamide
NQ : Deamidation
NR : Nitrate réductase
NUE : Nitrogen use efficiency (ou EUA)

O

OMS : Organisation mondiale de la santé
ONIC : Office national interprofessionnel des grandes cultures

P

P : Phosphore
PANTHER : Protein analysis through evolutionary relationships
PAR : Photosynthetically active radiation (ou rayonnement actif pour la photosynthèse)
PASEF : Parallel accumulation serial fragmentation
PEI-AGRI : Partenariat européen pour l'innovation agricole
PFC : Product function category (ou catégorie de matières constitutives, CMC)
PGPR : Plant growth-promoting rhizobacteria
PIP : Protéine intrinsèque de la membrane plasmique
PLATIN' : Plateau d'isotopie de Normandie
PLSR : Partial least square regression
PMG : Poids de mille grains (ou TGW)
PREPA : Plan national de réduction des émissions de polluants atmosphériques
PRIDE : Proteomics identifications database
PS : Poids spécifique, ou specific weight

R

RCB : Rubisco-containing-bodies
RMSE : Root mean square error
RMT : Réseau mixte technologique
RNA : Acide ribonucléique (ARN), ribonucleic acid

ROS : Reactive oxygen specie (ou espèce réactive de l'oxygène)

S

S : Soufre
SA : Acide salicylique
SAG : Senescence-associated gene
SAS : Société par actions simplifiée
SE : Erreur standard, standard error
Se : Sélénium
SFR : Structure fédérative de recherche
SG : Savitzky-Golay
Si : Silicium, silicon
SIP : Petite protéine membranaire intrinsèque de base
SL : Strigolactones
SNR : Signal to noise ratio
SNV : Standard normal variate
SPAD : Soil plant analysis development
SW : Specific weight

T

T : Traitement biostimulant, biostimulant treatment
T. : Triticum
TGW : Poids de mille grains, thousand grain weight (ou PMG)
TIC : Total ion current
TIMS-TOF : Trapped ion mobility mass spectrometry - time-of-flight
TIP : Protéine intrinsèque tonoplastiques

U

UAN : Urea ammonium nitrate (solution azotée)
UDP : Uridine diphosphate
UMR : Unité mixte de recherche
UN : Unité d'azote, kilogramme d'azote par hectare
UNICAEN : Université de Caen
UNIFA : Union des industries de la fertilisation
UV : Ultraviolet

V

VNT : Via Végétale nitrogen treatment

W

W : Force boulangère

X

XRF : Fluorescence à rayon X, X ray fluorescence

Z

Zn : Zinc

Table des matières

Remerciements i
Liste des abréviations vii
CHAPITRE I – INTRODUCTION GÉNÉRALE 1
CHAPITRE II – SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 7
I. Le blé tendre 7
I.1 Origine du blé 7
I.2 Éléments botaniques 8
I.2.a La plante 8
I.2.b L'épi de blé 9
I.2.c Le grain de blé 9
I.3 Cycle de développement et itinéraire technique du blé 10
I.4 La qualité et les protéines du grain 11
I.4.a Les critères de qualité du grain 11
I.4.b Les protéines du grain 12
I.4.b.a Les protéines de réserve 13
I.4.b.b Les protéines métaboliques 14
I.5 Rendement et qualité du grain : deux paramètres indissociables 15
I.5.a Des variables interconnectées 15
I.5.b Elaboration des composantes du rendement et de la qualité du blé 15
I.5.b.a Composantes mises en place pendant la phase végétative 16
I.5.b.b Composantes mises en place pendant la phase reproductive 17
I.5.b.c Relation négative entre rendement et teneur en protéines du grain 19
II. L'azote dans l'agriculture 20
II.1 Les engrais minéraux pour la production agricole 21
II.1.a L'urée granulée 22
II.1.b L'ammonitrate 22
II.1.c La solution azotée 23
II.1.d Les différentes formes minérales dans le sol 23
II.2 L'efficience d'usage de l'azote et ses composantes 24
II.2.a Efficience d'Absorption des différentes formes d'azote 26
II.2.a.a Absorption du nitrate 26
II.2.a.b Absorption de l'ammonium 29

II.2.a.c Absorption de l'urée 31
II.2.b Efficience d'Assimilation de l'azote 33
II.2.b.a Dégradation de l'urée en ammonium 33
II.2.b.b Réduction du nitrate en ammonium 34
II.2.b.c Assimilation de l'ammonium 35
II.2.c Efficience de Remobilisation de l'azote 36
II.3 Azote et environnement 38
II.3.a Le lessivage des nitrates 39
II.3.b La volatilisation d'ammoniac et d'oxydes d'azote 39
II.3.b.a Les émissions d'ammoniac 39
II.3.b.b Les émissions d'oxydes d'azote 40
III. Stratégies pour limiter les risques environnementaux liés aux engrais azotés 41
III.1 La libération contrôlée des fertilisants azotés 41
III.1.a Les inhibiteurs de l'uréase et de la nitrification 41
III.1.b L'enrobage des engrais azotés pour libérer progressivement l'azote 42
III.2 Les biostimulants 43
III.2.a Définitions et propriétés 43
III.2.b Principales catégories 44
III.2.b.a Les extraits de végétaux 45
III.2.b.b Les microorganismes et leurs extraits 45
III.2.b.c Les acides aminés et protéines hydrolysées 46
III.2.b.d Les substances humiques 46
III.2.b.e Les substances minérales non nutritives 47
III.2.c Intérêt des biostimulants pour optimiser l'EUA 47
III.2.d Les biostimulants pour augmenter la productivité et la qualité du blé 48
III.3 Des outils de diagnostic pour l'optimisation de la nutrition des plantes et de la qualité des produits de récolte 48
III.3.a Des outils pour optimiser l'EUA 49
III.3.b Intérêt de la fluorescence à rayons X pour la détermination du statut nutritionnel et des modifications du ionome 50
III.3.c La spectrométrie proche infrarouge : un outil polyvalent 50
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE 51
CHAPITRE III – MATÉRIELS ET MÉTHODES 55
I. Conditions de culture et matériel végétal 55

I.1 Dispositif en conditions contrôlées 55
I.2 Dispositif au champ 56
I.2.a Conditions de culture en 2018-2019 56
I.2.b Conditions de culture en 2019-2020 57
II. Analyses physiologiques, élémentaires, biochimiques et protéomiques 59
II.1 Estimation de la teneur en azote (Articles A, C et E) 59
II.2 Analyses élémentaires 59
II.2.a Analyse de l'azote total par spectrométrie de masse isotopique (IRMS) (Articles A, C, D et E) 59
II.2.b Analyses multi-élémentaires 60
II.2.b.a Par spectrométrie de masse haute résolution à plasma à couplage inductif (ICP-MS-HR) (Articles A et C) 60
II.2.b.b Par fluorescence à rayon X (Article C) 61
II.3 Dosage de la teneur en phytates de la farine (Article A) 62
II.4 Analyse protéomique de la farine (Articles A et B) 62
III. Méthodologie statistique 63
CHAPITRE IV – RÉSULTATS 65
A. Biostimulant effects of Glutacetine® and its derived formulations mixed with N fertilizer on post-heading N uptake and remobilization, seed yield and grain quality in winter wheat 66
Abstract 66
I. Introduction 67
II. Materials and methods 70
II.1 Experiment under greenhouse conditions (Experiment 1) 70
II.1.a Experimental design and tissue sampling 70
II.1.b Determination of leaf senescence speed and components of N use efficiency 72
II.1.c Seed yield components 72
II.1.d Components of grain quality 72
II.2 Experiment under field conditions (Experiment 2) 74
II.3 Statistical analysis 75
III. Results 76
III.1 Effect of the formulations under greenhouse conditions (Exp. 1) 76
III.1.a Effect of the formulations on biomass, seed yield and grain parameters 76
III.1.b Effect of the formulations on N status and N partitioning at the whole plant level 77

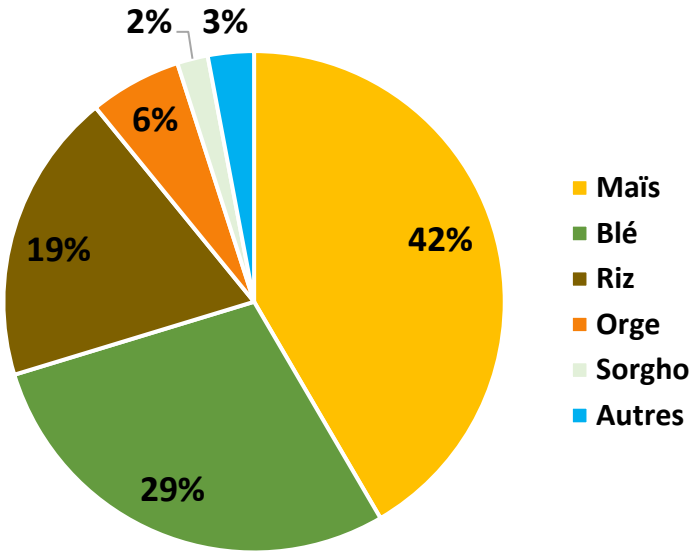
III.1.c Impact of the formulations on N uptake and N remobilization between heading and maturity 78
III.1.d Impact of biostimulant formulations on wheat grain quality 78
III.2 Impact of VNT4 under contrasting field conditions (Exp. 2) 80
IV. Discussion 81
IV.1 Formulations enhanced straw biomass, increased grain yields, and impacted the components of grain yield 82
IV.2 Formulations induced differences in post-heading N uptake and N remobilization 83
IV.3 Biostimulants supplied to N fertilizer changed the ionome and phytate concentrations and affected protein concentration and quality in wheat grain 85
IV.3.a Grain ionome and phytate concentrations 85
IV.3.b Protein content and quality 87
IV.4 Organic acids enhanced the effect of glutamic acid in wheat plants 89
IV.5 VNT4 increased yield and NUE under field conditions 89
V. Conclusion 90
B. Biostimulant impacts of Glutacetine® and derived formulations (VNT1 and VNT4) on the bread wheat grain proteome 94
Abstract 94
I. Introduction 95
II. Materials and methods 98
II.1 Experimental design and tissue sampling 98
II.2 Protein extraction and workflow used for proteomics analysis 99
II.2.a Protein extraction 99
II.2.b Protein preparation for proteomics analysis 99
II.2.c Mass spectrometry analysis 100
II.2.d Peptide sequencing and protein precursor identification 100
II.3 Statistical and functional data analysis 101
III. Results and discussion 102
III.1 Global analysis of the grain proteome 102
III.2 Proteins involved in protein synthesis regulation processes are affected by Glutacetine®-based formulations 103
III.3 VNT1 and VNT4 provoke changes in proteins involved in development 104
III.4 Glutacetine®-based formulations lead to changes in proteins involved in defence and responses to stress 107

III.5 Proteins involved in C and N metabolism related to wheat grain quality traits are strongly affected by Glutacetine®-based formulations 109
IV. Conclusions 113
C. Glutacetine® biostimulant applied on wheat under contrasting field conditions improves grain number leading to better yield, upgrades N-related traits and changes grain ionome 117
Abstract 117
I. Introduction 117
II. Results 121
II.1 Effects of site, N fertilizer forms and Glutacetine® on grain yield and its components 121
II.2 Impacts of site, N fertilizer forms and Glutacetine® on N-related traits 122
II.3 Effects of site, N fertilizer forms and Glutacetine® on the grain ionome 124
II.4 Effects of site, N fertilizer forms and Glutacetine® on the straw ionome 125
III. Discussion 126
III.1 Glutacetine® improves grain yield by increasing grain number per spike and per square meter 126
III.2 Glutacetine® affects NUE and total grain N differently 128
III.3 Glutacetine® induces changes in the grain and straw ionomes 129
IV. Materials and methods 131
IV.1 Field experiment design 131
IV.2 Seed yield components and N use efficiency 132
IV.3 Elemental analysis 132
IV.4 Statistical analysis 133
V. Conclusion 134
D. VNT4, a derived formulation of Glutacetine® biostimulant, improved yield and N-related traits of bread wheat when mixed with urea-ammonium-nitrate solution 137
Abstract 137
I. Introduction 137
II. Materials and methods 141
II.1 Field experiment design under contrasting conditions (Experiment 1) 141
II.2 ^{15}N experiment under field conditions (Experiment 2, Site 4) 142
II.3 N and ^{15}N analyses 143
II.4 Elemental analysis in flag leaves 143
II.5 Grain yield components and N use efficiency 144

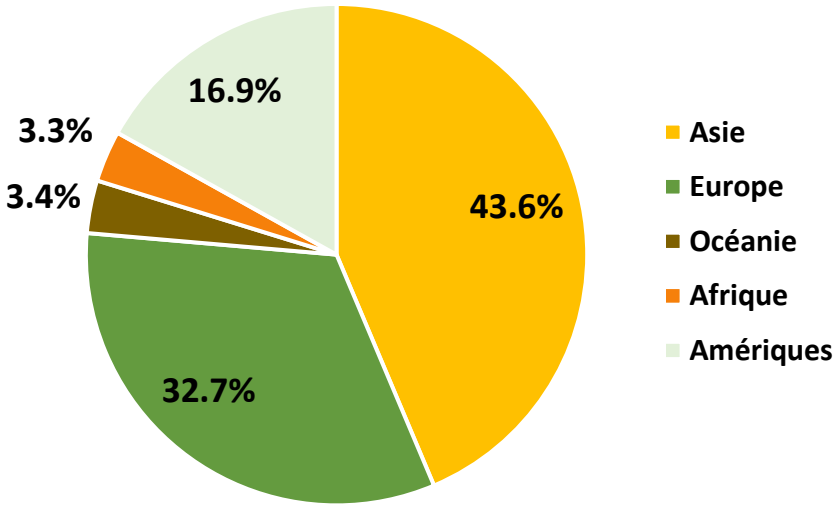
II.6 Statistical analysis 144
III. Results 144
III.1 Experiment 1: study of the impact of VNT4 on grain yield, yield components and N-related traits under six contrasting field trials 144
III.1.a Impacts of year, site and VNT4 on grain yield and its components 145
III.1.b Effects of year, site and VNT4 on N-related traits 146
III.2 Experiment 2: dynamics of growth, total N and N uptake using the ^{15}N labelling method 147
III.2.a Impacts of VNT4 on growth during the crop cycle 147
III.2.b Effects of VNT4 on total N and ^{15}N uptake during the crop cycle 147
III.2.c Impacts of VNT4 on elemental contents in flag leaves 148
IV. Discussion 149
IV.1 VNT4 improved yield by increasing grain number per square metre and/or TGW despite strong year and site effects 149
IV.2 VNT4 increased total grain N and NUE irrespective of the pedoclimatic conditions and the N supply 151
IV.3 The beneficial impacts of VNT4 are also related to the enhancement of plant growth and improvements in S, Zn and Mo contents in flag leaves 153
V. Conclusions 155
E. Assessment of portable NIRS measurement on flag leaf at flowering stage for the prediction of grain N and yield components in bread wheat 158
Abstract 158
I. Introduction 159
II. Materials and methods 162
II.1 Field experiment design 162
II.2 N analysis by IRMS 163
II.3 Near infrared spectra acquisition 163
II.4 NIRS calibration development 163
II.4.a Sample preparation and reference data set 163
II.4.b Prediction model 164
II.4.c Elimination of outliers 165
II.4.d Validation and correlation 165
II.4.e Software 165
III. Results 166
III.1 Description of the spectra 166

III.2 Creation and validation of PLSR models 166
III.2.a N content in flag leaves and grain yield prediction 166
III.2.b Prediction of N content in grain, SW and TGW by grain NIRS spectra 166
III.2.c Prediction of N content in grain, SW and TGW by flag leaf NIRS spectra at flowering 167
IV. Discussion 168
IV.1 Prediction of N content in flag leaves irrespective of the stage 168
IV.2 Prediction of grain characteristics at maturity 169
IV.3 Predicting N content in grain and yield components using flag leaf spectra at flowering stage 169
V. Conclusion 171
CHAPITRE V – DISCUSSION GÉNÉRALE 173
I. Les formulations à base de Glutacétine® optimisent l'EUA chez le blé 174
I.1 La Glutacétine®, VNT1 et VNT4 améliorent l'absorption d'azote 174
I.2 Les formulations à base de Glutacétine® augmentent l'efficience de remobilisation de l'azote 174
I.3 VNT4 et la Glutacétine® accroissent l'EUA et l'azote exporté par les grains 175
II. Les formulations à base de Glutacétine® déplafonnent les rendements du blé 176
III. Les formulations à base de Glutacétine® modifient la qualité de la farine de blé 178
IV. La Glutacétine® et son dérivé VNT4 sont profitables sur le plan agro-économique et agro-environnemental 179
IV.1 Bilan économique lié à l'utilisation de la Glutacétine® et de VNT4 179
VI.2 VNT4 limite les effets négatifs de l'azote sur l'environnement 179
V. Multiplex®, SPAD, XRF et NIRS : des outils utiles pour évaluer les pratiques agronomiques 181
CHAPITRE VI – PRINCIPALES PERSPECTIVES 184
I. Améliorer les dispositifs expérimentaux pour mieux évaluer les effets biostimulants 184
II. Optimiser les apports de biostimulants pour accroitre les performances agronomiques 185
III. Approfondir les recherches pour mieux comprendre l'impact des biostimulants dans la plante 186
IV. Poursuivre le travail sur les outils de diagnostic 187
Références bibliographiques 189

CHAPITRE I : Introduction générale



Répartition de la production mondiale de céréales par espèce pour la campagne 2019/2020 (USDA, 2020).

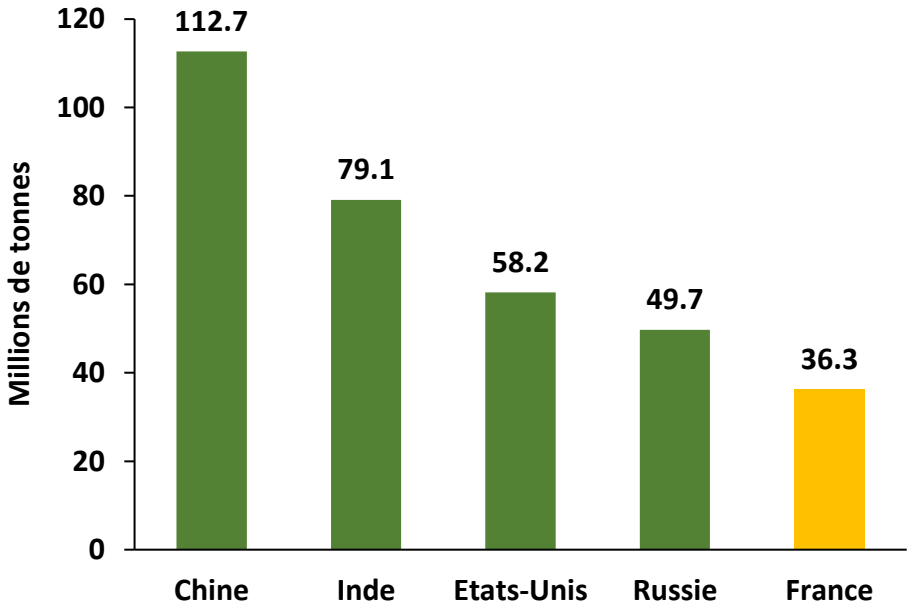


Répartition de la production mondiale de blé par continent. Moyenne de 1994 à 2019 (FAOSTAT, 2021).

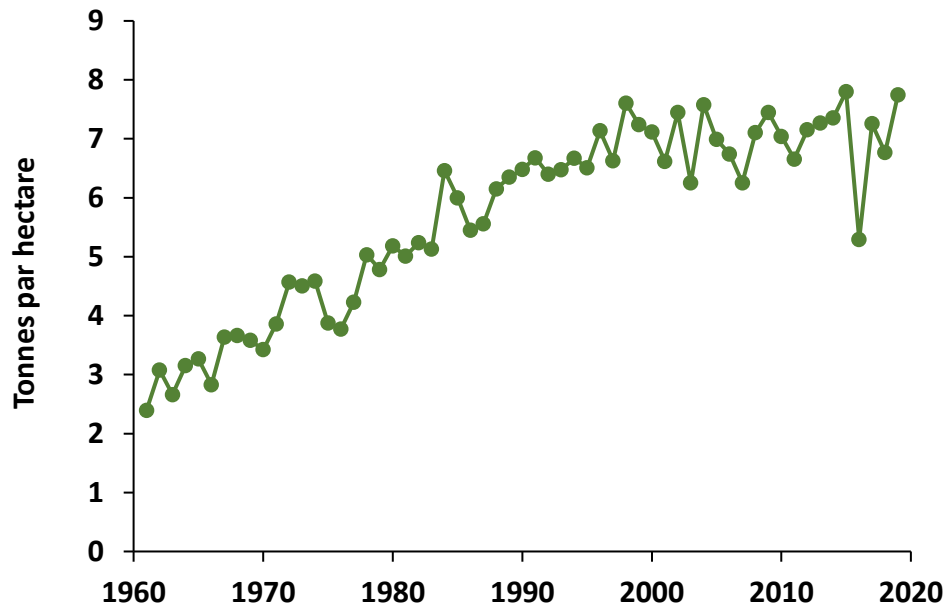
CHAPITRE I – INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'agriculture est essentielle puisqu'elle doit assurer l'alimentation de l'ensemble de la population en quantité et en qualité. Elle permet par ailleurs de fournir d'autres matières premières dans de nombreux domaines notamment pour l'industrie (santé, cosmétique, chimie verte, biomatériaux, bioplastiques, biocarburants, etc.). Première céréale produite en Europe, le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) présente des enjeux agroalimentaires et économiques majeures.

Depuis l'avènement de l'agriculture, le blé est à la base de l'alimentation des populations indo-européennes. Cette culture est produite sous de nombreuses latitudes grâce à une très grande diversité génétique, plus de 25 000 écotypes (Shewry, 2009), adaptée aux différentes régions du monde. Aujourd'hui, le blé est l'une des céréales les plus cultivées dans le monde avec près de 216 millions d'hectares (FAOSTAT). Il se classe en deuxième position derrière le maïs (Figure I.1). A l'échelle mondiale, les rendements du blé augmentent continuellement depuis 1961. Cela fait suite à la révolution verte, une période marquée par de nombreuses innovations de rupture dans différents secteurs agricoles. En effet, le machinisme, l'agronomie, l'utilisation d'intrants et la génétique ont connu des avancées considérables. Ces évolutions ont permis d'atteindre un rendement moyen de 3,5 t ha^{-1} pour parvenir à une production mondiale de 766 millions de tonnes (Mt) en 2019 (FAOSTAT). Sur une moyenne entre 1994 et 2019, l'Asie est le premier producteur mondial de blé (43,6%), suivie par l'Europe (32,7%), l'Amérique (16,9%), l'Océanie (3,4%) et l'Afrique (3,3%) (Figure I.2). La forte production de l'Asie provient essentiellement de la Chine et de l'Inde puisqu'il s'agit des deux premiers producteurs mondiaux (112,7 et 79,1 Mt, respectivement, Figure I.3). Les Etats-Unis produisent en moyenne 58,2 Mt par an (3ème producteur) alors que la Russie récolte 49,7 Mt de blé (4ème producteur) (Figure I.3). Malgré sa petite superficie, la France se classe en 5ème position (36,3 Mt, Figure I.3) grâce à des rendements élevés (6,9 t ha^{-1} en moyenne). En 2019, la France a produit 40,6 Mt de blé sur 5,2 millions d'hectares, soit un rendement moyen de 7,8 t ha^{-1} (FAOSTAT). La France, leader sur le marché européen, consacre chaque année un sixième de ses surfaces agricoles utiles à cette culture. La production de blé tendre est localisée principalement dans les plaines de climat océanique du Centre, du Bassin aquitain, de l'Ouest et surtout du Bassin parisien. Afin de répondre à une demande toujours croissante, l'augmentation des rendements est un objectif majeur depuis plusieurs décennies



Classement des cinq premiers producteurs mondiaux de blé.
Moyenne de 1994 à 2019 (FAOSTAT, 2021).



Rendement en blé ces 60 dernières années en France. (FAOSTAT, 2021)

pour les programmes de recherche (sélection variétale et pratiques agronomiques notamment). L'intensification des modes de production a permis d'augmenter les rendements de manière remarquable en France passant d'environ 2 t ha^{-1} (20 q ha^{-1}) en 1945 à 7 t ha^{-1} durant les années 1990 (Figure I.4). Cette période, correspondant à la révolution verte, a permis à la France et à l'Europe de devenir autosuffisante. Néanmoins, les rendements ont tendance à stagner depuis une quinzaine d'années (Figure I.4, Brisson et al., 2010). Le principal facteur explicatif est l'augmentation de la fréquence d'évènements climatiques défavorables durant le cycle de production. Il s'agit essentiellement d'épisodes de sécheresse pendant la montaison ainsi que de températures élevées durant le remplissage du grain. Parallèlement, les crises alimentaires notamment de 2008 et 2011 ont montré les difficultés pour nourrir la population mondiale. Leurs origines sont complexes et liées à de nombreux facteurs : la croissance de la population, l'augmentation du prix des denrées alimentaires, le coût des fertilisants, le dérèglement climatique, la réduction des surfaces agricoles cultivables (en concurrence avec d'autres domaines d'activités humaines), le gaspillage alimentaire, etc. La priorité pour le monde agricole est donc de continuer à améliorer les rendements des productions végétales tout en maintenant la qualité des produits récoltés en proposant des itinéraires techniques plus respectueux de l'environnement.

Compte tenu de la croissance de la démographie attendue lors des 50 prochaines années mais aussi du développement de pays émergents, l'utilisation d'engrais notamment azotés sera inévitablement croissante. L'utilisation d'engrais minéraux au niveau mondial dépassait déjà les 200 millions de tonnes en 2018, soit 25 % de plus qu'en 2008 (FAOSTAT), alors que plus de la moitié de l'azote (N) apporté aux cultures n'est pas absorbée par les plantes (Lassaletta et al., 2014). Tandis que la fertilisation azotée joue un rôle essentiel sur la croissance des végétaux, le rendement et la qualité des produits récoltés, l'efficience d'usage de l'azote (EUA) est faible à cause des pertes importantes par volatilisation et/ou par lixiviation. Ces pertes d'azote ont d'abord des conséquences financières pour l'agriculteur puisque l'azote perdu n'est pas valorisé en production de denrées agricoles. De plus, ces fuites engendrent des problématiques environnementales et de santé publique telles que des émissions de gaz à effet de serre (N_2O), des émissions d'ammoniac (générateur de particules fines et contribuant à l'acidification de l'air) et la pollution des eaux de surface (NO_3^-) conduisant à des risques d'eutrophisation/dystrophisation. L'agriculture doit donc relever

trois défis majeurs en même temps : assurer l'approvisionnement alimentaire de la population, maintenir un revenu agricole adéquat et réduire l'impact des engrais azotés sur l'environnement. Il est donc crucial d'élaborer de nouvelles stratégies conduisant à une meilleure gestion de l'azote afin de répondre aux exigences environnementales tout en tenant compte des aspects économiques. Il existe des solutions efficaces pour inhiber à la fois les activités nitrifiante et uréasique des enzymes à l'origine de la dégradation des fertilisants azotés dans le sol. Les inhibiteurs de la nitrification, comme le 3,4-dimethypyrazole phosphate (DMPP), et les inhibiteurs de l'uréase, comme le N-(n-butyl)thiophosphoric triamide (NBPT), sont les plus utilisés en agriculture. Néanmoins, l'ANSES a récemment montré sa préoccupation concernant les risques pour la santé et l'environnement liés à ces inhibiteurs (ANSES, 2019). Dans ce contexte, les biostimulants pourraient être une alternative sans risque et efficace pour améliorer l'EUA (du Jardin, 2015). En effet, l'emploi de biostimulants peut permettre d'optimiser les performances agronomiques du blé en termes d'efficience d'absorption et d'utilisation (assimilation et remobilisation) de l'azote. Par ailleurs, le consommateur s'intéresse de plus en plus à la qualité des produits. Depuis plusieurs années, certaines personnes éliminent peu à peu le blé de leur alimentation à cause des problèmes intestinaux liés au gluten. Environ 1% de la population est intolérante au gluten (maladie cœliaque) tandis que 0,5 à 15% est hypersensible (Mumolo et al., 2020). Au total, ce sont près de 30% des adultes qui disent diminuer ou éviter l'achat de produits contenants du gluten. Lorsque la farine est humidifiée, ce sont les protéines de réserves du blé qui se lient pour former un réseau : le gluten. Cette formation du gluten confère à la farine de blé des propriétés boulangères très spécifiques mais la formation de cette « colle » (gluten est un terme dérivé du latin signifiant colle, glue, gomme) engendre des complications digestives à une partie de la population. De récents travaux ont montré que les biostimulants pouvaient impacter la quantité et la qualité des protéines du grain de blé dur (Pichereaux et al., 2019). Les biostimulants pourraient donc être une solution pour produire des blés ayant un profil protéique plus facilement digestible.

Dans un tel contexte, l'application de biostimulants sur le blé pourrait être une stratégie sans risque pour l'Homme et l'environnement, efficace pour optimiser l'EUA (et donc limiter les pollutions liées à l'azote) et intéressante pour améliorer le profil protéique du blé (satisfaisant ainsi le consommateur). L'entreprise Via Végétale dispose d'une formulation

brevetée et commercialisée sous le nom Balsamo en France (Glutacétine®, AMM n°1220000, agent azoto-nutritionnel). Associé à la solution azotée, cet additif permet une application foliaire de l'azote sans risque de brûlure, facilite la traversée de la cuticule et active le métabolisme azoté pour une efficience maximale d'assimilation et d'utilisation de l'azote. Une application de cette technologie seule en foliaire ou au sol avec les fertilisants classiques (urée, solution azotée et ammonitrate) pourrait montrer un fort intérêt sur les plans agronomique et environnemental. **Dans un premier temps, les recherches développées dans le cadre de cette thèse visaient d'une part, à réaliser des tests en conditions contrôlées afin de cribler de nouveaux biostimulants appliqués en tant qu'additifs aux engrais azotés**. Il s'agissait d'autre part d'évaluer l'effet des biostimulants les plus prometteurs sur le protéome du blé tendre d'hiver. Dans un deuxième temps, des recherches plus approfondies ont été entreprises pour **valider les effets observés précédemment en serre en testant les biostimulants présentant les caractéristiques les plus intéressantes (rendement, EUA et qualité grainière) en plein champ dans des conditions pédoclimatiques normandes contrastées**. Parallèlement, l'étude de la contribution et du devenir de l'azote apporté, en absence ou en présence du biostimulant le plus intéressant, a été menée à l'aide d'un marquage ^{15}N et d'outils de diagnostic. La distribution du traceur dans les différents compartiments (sol-plante-air) tout au long du cycle de la culture de blé a permis d'établir un bilan azoté.

Ce travail a ainsi été conduit dans le cadre d'une thèse CIFRE cofinancée par l'ANRT et Via Végétale (n°2017/1239) au sein l'UMR 950 Université de Caen – INRAE EVA (Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions N.C.S). Ce laboratoire, rattaché au Département AgroEcoSystèmes de l'INRAE, développe depuis près de 30 ans des recherches en physiologie, écophysiologie et écologie végétales centrées sur l'acquisition et la gestion des ressources azotées et carbonées des espèces de grande culture en interactions avec d'autres éléments minéraux. Au sein de l'UMR EVA, l'équipe INCCA (Interactions Nutritionnelles Conduites et Contraintes Abiotiques) travaille sur l'efficience d'usage de l'azote, du soufre (et plus récemment du phosphore) en s'inscrivant dans un contexte agronomique et environnemental de diminution des intrants azotés, d'intensification écologique, de changements globaux et de durabilité. Ce travail de thèse s'est aussi fortement appuyé sur le projet FIELD-Prot : « Développement de fertilisants innovants pour l'amélioration du bilan

environnemental et des performances agronomiques (rendement et qualité protéique) chez le blé ». Il s'agit d'un partenariat entre l'UMR EVA, la Chambre d'Agriculture de Normandie et la coopérative Agrial, financé par la Région Normandie et le FEADER (PEI-AGRI).

Ce manuscrit s'articule autour de trois grandes parties. Une partie introductive, qui fait état des connaissances actuelles et permet de préciser les objectifs de recherche, une seconde partie présente les résultats sous forme d'articles scientifiques, suivie d'une discussion générale, des conclusions et des perspectives de recherche issues de ce travail.

Les articles présentés dans la partie « résultats » du manuscrit sont les suivants :

- **Maignan, V.**, Bernay, B., Géliot, P., Avice, J.-C. Biostimulant Effects of Glutacetine® and Its Derived Formulations Mixed with N Fertilizer on Post-Heading N Uptake and Remobilization, Seed Yield and Grain Quality in Winter Wheat. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fpls.2020.607615.
- **Maignan, V.**, Bernay, B., Géliot, P. Avice, J.-C. Biostimulant impacts of Glutacetine® and derived formulations (VNT1 and VNT4) on the bread wheat grain proteome. *J. Proteomics*. **2021**, 244, 104265, doi:10.1016/j.jprot.2021.104265.
- **Maignan, V.**, Géliot, P., Avice, J.-C. Glutacetine® Biostimulant Applied on Wheat under Contrasting Field Conditions Improves Grain Number Leading to Better Yield, Upgrades N-Related Traits and Changes Grain Ionome. *Plants.* **2021**, 10, 456, doi:10.3390/plants10030456.
- **Maignan, V.**, Coquerel, R., Géliot, P. Avice, J.-C. VNT4, a derived formulation of Glutacetine® biostimulant, improved yield and N-related traits of bread wheat when mixed with urea-ammonium-nitrate solution. Agronomy. **2021**, 11, 1013, doi:10.3390/agronomy11051013.
- Coquerel, R., **Maignan, V.**, D'Hooghe, P., Roumet, P., Avice, J.-C. Assessment of portable NIRS measurement on flag leaf at flowering stage for the prediction of grain N and yield components in bread wheat (soumission prévue en **2021** dans *Field Crop. Res.*).

Ces résultats de recherche ont également fait l'objet de quatre participations à des congrès nationaux et internationaux :

- **Maignan, V.,** Geliot, P., Vecrin, R., Coquerel, R., Avice, J-C. Evaluation of innovative fertilizer additives on the physiological impacts, agronomic performances and protein quality in winter wheat. **XVI European Society for Agronomy Congress**. 2020, O32.
- **Maignan, V.**, Avice, J-C., Geliot, P. Évaluation de différents additifs aux fertilisants azotés sur l'efficience d'usage des nutriments, le rendement et la qualité du blé tendre. **Phloème 2020**. 2020, P32.
- **Maignan, V.**, Avice, J-C., Geliot, P. Evaluation of the efficiency of new additives to fertilizers on the improvement of the nitrogen uptake, assimilation and remobilization by wheat and impacts on yield and grain quality. **4th Biostimulants World Congress**. 2019, P138.
- **Maignan, V.**, Geliot, P., Avice, J-C. Evaluation de l'efficacité d'additifs aux engrais sur l'amélioration de l'absorption, de l'assimilation et de la remobilisation de l'azote par le blé. **14ème RENCONTRES Comifer-Gemas 2019.** 2019, P10.

CHAPITRE II : Synthèse bibliographique

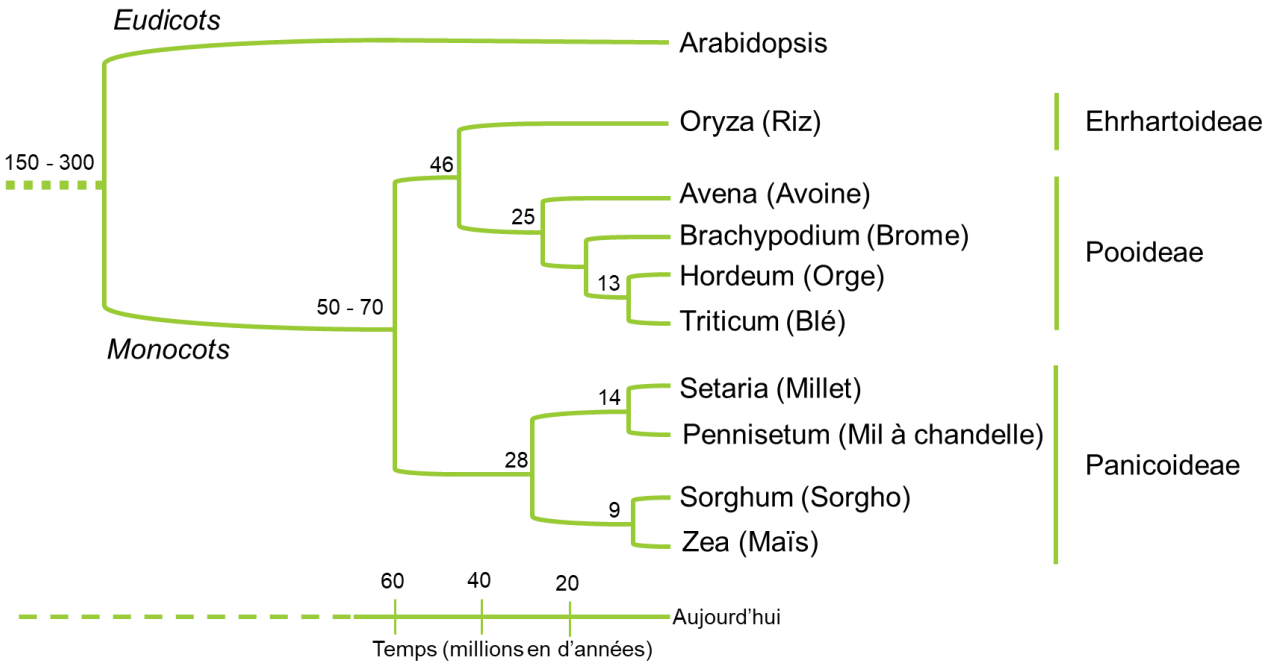


Figure II.1 : Arbre phylogénétique des principales céréales cultivées dans le monde. Les dates de divergence en espèces sont exprimées en millions d'années (d'après Bolot et al., 2009).

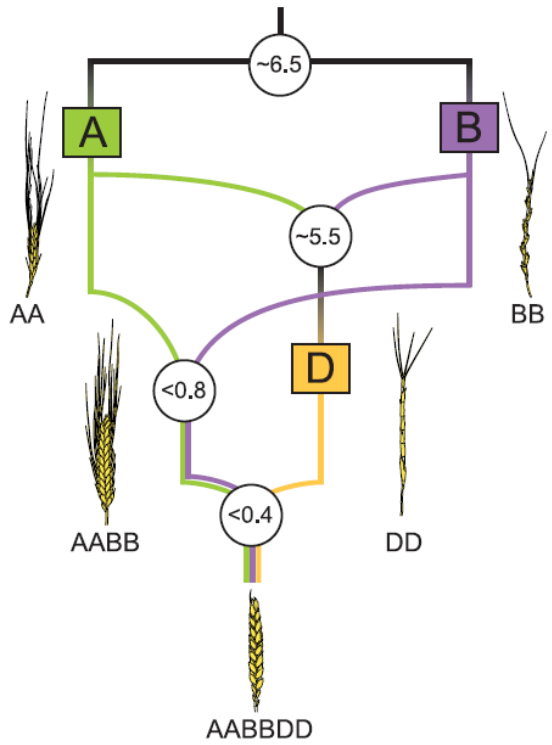


Figure II.2 : Schéma de l'histoire phylogénétique du blé tendre (*T. aestivum* ; AABBDD). La première hybridation a eu lieu il y a environ 5,5 millions d'années entre les génomes A et B pour donner un génome DD au fil des générations. Puis, une seconde hybridation s'est réalisée entre *T. urartu* (AA) et *Ae. speltoide* (BB) pour faire apparaitre un tétraploïde (*T. turgidum* ; AABB). Enfin, une troisième hybridation entre *T. turgidum* et *Ae. tauschii* (DD) a donné naissance à l'ancêtre du blé tendre (Marcussen et al., 2014).

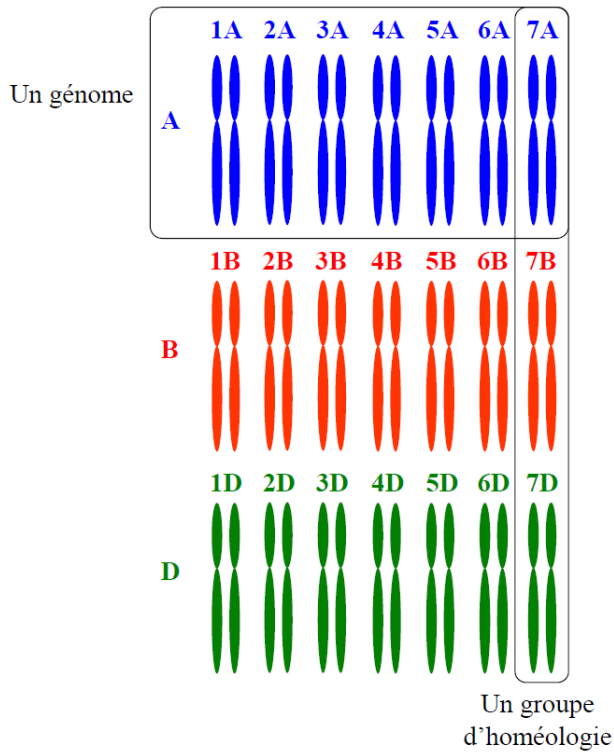


Figure II.3 : Organisation du génome du blé hexaploïde. En intégrant les trois génomes homéologues A, B et D issus des différentes hybridations au cours du temps, ce génome est composé de 42 chromosomes. Trois paires de chromosomes homéologues forment un ensemble que l'on nomme « groupe d'homéologie » (Bogard, 2011).

CHAPITRE II – SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le blé tendre

I.1 Origine du blé

Le blé tendre (*Triticum aestivum L.*) est une céréale qui appartient aux Triticées. Il s'agit de plantes monocotylédones de la famille des Poacées (environ 12 000 espèces) qui fait partie plus largement des angiospermes monocotylédones (Figure II.1). De nombreuses espèces de la tribu des Triticées ont été domestiquées et présentent aujourd'hui un intérêt économique majeur puisqu'elles contribuent à une grande partie des ressources alimentaires de l'humanité. C'est le cas notamment du maïs (*Zea*), du riz (*Oriza*) et du sorgho (*Sorghum*). D'autres participent à l'alimentation du bétail tels que le dactyle (*Dactylis*), la fétuque (*Festuca*) ou encore le ray-grass (*Lolium*). Enfin l'orge (*Hordeum*) et le seigle (*Secale*) sont des espèces très proches du blé tendre. Le terme céréale désigne les espèces de Poacées cultivées pour leurs graines et qui sont récoltées pour l'alimentation humaine ou animale.

Les blés cultivés aujourd'hui appartiennent donc au genre *Triticum*. Différents évènements de polyploïdisation au cours de l'histoire phylogénétique du blé tendre sont à l'origine des divers niveaux de ploïdie observés de nos jours. On peut ainsi distinguer des espèces diploïdes comme le petit épeautre (*T. monococcum*), des espèces tétraploïdes tels que l'amidonnier (*T. turgidum*) et des espèces hexaploïdes avec le blé tendre (*T. aestivum*). Les blés tétraploïdes se sont scindés en plusieurs sous-espèces telles que le blé dur (*T. durum*) et l'amidonnier domestiqué (*T. turgidum*). Il s'est produit le même phénomène pour les blés hexaploïdes qui possèdent deux sous-espèces cultivées : le grand épeautre (*T. aestivum* spp *spelta*) et le blé tendre (*T. aestivum* spp *aestivum*). Bien avant la domestication du blé tendre, 2 différentes hybridations ont eu lieu au cours de l'évolution (Figure II.2). Tout d'abord, il y a environ 800 000 ans, une espèce tétraploïde est née suite à l'hybridation entre *T. urartu* (AA) et *Ae. Speltoides* (BB) ; le blé dur et le blé amidonnier dérive de ce tétraploïde AABB. Ensuite, il y a environ 400 000 ans, une hybridation a eu lieu entre ce blé tétraploïde et *Ae. Tauschii* (DD) aboutissant à l'ancêtre hexaploïde (AABBDD) du blé tendre et de l'épeautre. Les blés hexaploïdes sont constitués de 3 génomes différents : A, B et D (Figure II.2). Chacun est constitué de 7 paires de chromosomes ce qui fait un total de 42 chromosomes pour le blé tendre (Figure II.3).

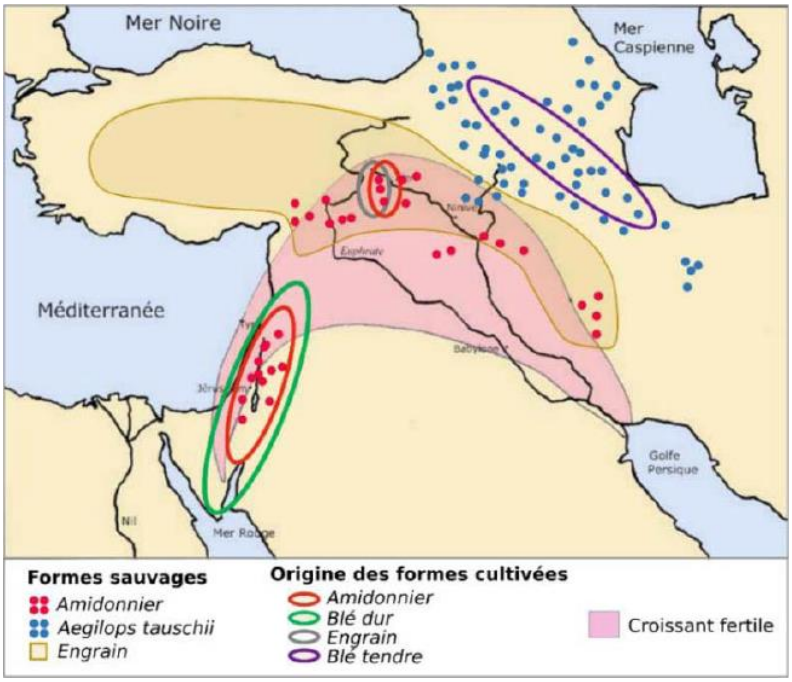


Figure II.4 : Origine géographique des blés cultivés. La distribution approximative du blé amidonnier cultivé est représentée par la zone cerclée en rouge, celle du blé dur en vert, celle de l'engrain en gris et enfin celle du blé tendre en mauve (Dubcovsky and Dvorak, 2007).

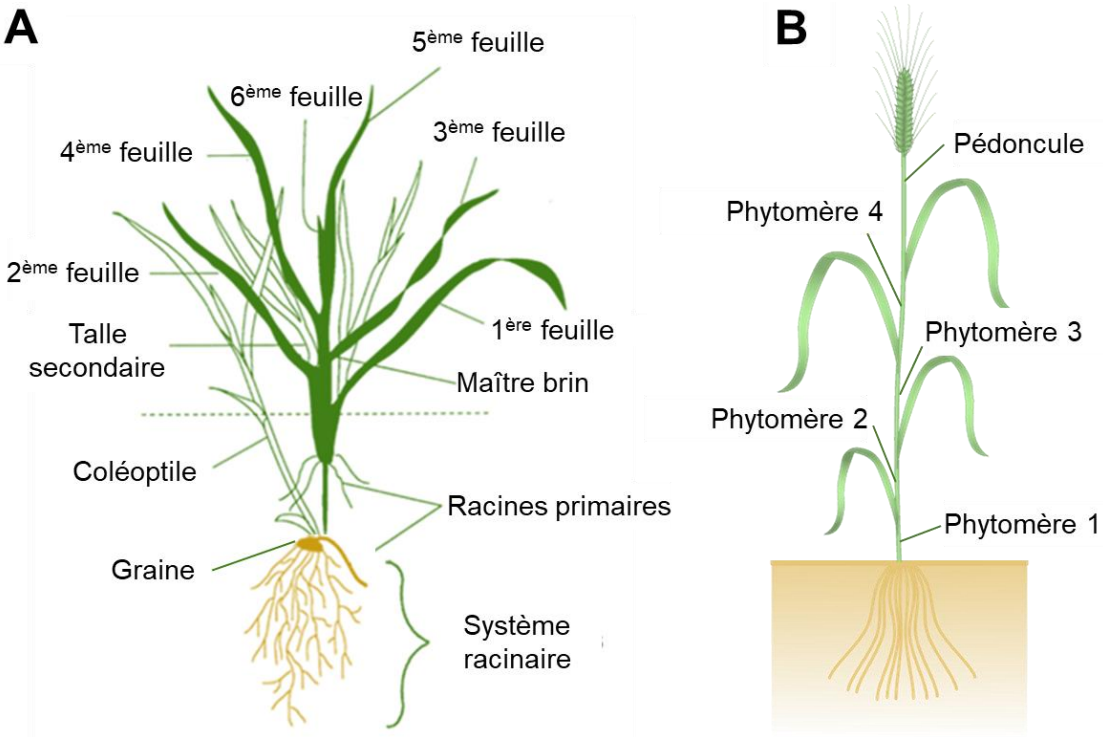


Figure II.5 : Structure aérienne et racinaire des herbacées (A) aux stades tallage et (B) postfloraison. (A) On peut aisément distinguer le maître brin des talles secondaires ainsi que le système racinaire. (B) Au cours du développement de la plante, chaque talle forme son appareil racinaire, ses phytomères, son pédoncule et son épi. Chaque phytomère comprend un nœud, un entre-nœud, une gaine foliaire et un limbe foliaire (d'après Klepper et al., 1982; Moore and Moser, 1995).

Il y a environ 10 000 ans, les premières cultures de blé sont apparues au moment de la révolution néolithique en Mésopotamie (Shewry, 2009). Il s'agit alors pour l'homme d'une période de transition d'un mode de vie centré sur la chasse et la cueillette vers un autre basé sur l'agriculture et l'élevage. Cela entrainera par la suite sa sédentarisation. Les premiers blés cultivés sont l'engrain diploïde (*T. monococcum*) et l'amidonnier tétraploïde (*T. turgidum spp dicoccum*). Les premières traces ont été retrouvées entre l'amont du Tigre et de l'Euphrate qui correspondent aux territoires de l'actuelle Syrie et de la Turquie (Figure II.4). Le blé tendre a été localisé plus au Nord, entre le Nord-Est de la Turquie et le Nord-Ouest de l'Iran (Figure II.4; Dubcovsky and Dvorak, 2007). Le blé est arrivé en Europe vers -8000 ans avant JC. Puis, cette culture s'est étendue à l'Est du croissant fertile pour atteindre la Chine vers -5000 et au Sud-Ouest vers l'Egypte vers -6000 avant JC. Il faudra attendre le 16ème siècle pour voir des cultures de blé en Amérique (introduit par les colons espagnols) et le 18ème siècle pour l'Australie grâce aux anglais (Shewry, 2009). Ces espèces sont très largement représentées dans l'agriculture actuelle. De fait, leurs caractéristiques botaniques et agronomiques ont été très largement étudiées.

I.2 Éléments botaniques

I.2.a La plante

Le blé tendre est une plante herbacée annuelle à croissance définie. Il est constitué de plusieurs brins que l'on appelle les talles (Figure II.5.A). Chaque talle est composée d'une tige (partie végétative) et d'un épi (partie reproductive). Au sein de la tige, on peut différencier les différents phytomères à partir de la base de la tige (Figure II.5.B). Chaque phytomère démarre d'un bourgeon et comprend le segment de tige (correspondant à l'entre-nœud), le nœud et la feuille situés au-dessus de ce bourgeon. Le pédoncule est quant à lui le lien entre la dernière feuille et l'épi. Issue du bourgeon apical, la première talle constitue le maître brin alors que les talles suivantes (issues de bourgeons axillaires) sont les talles secondaires (Figure II.5.A). Ces dernières sont des ramifications du maître brin. Elles sont émises au niveau du plateau de tallage à la base de la plante. Les talles apparaissent une à une au cours du développement du blé. Afin de les caractériser, chaque talle secondaire est numérotée en fonction de leur apparition. Enfin, par opposition au système aérien, le blé tendre est composé d'un système racinaire fasciculé.

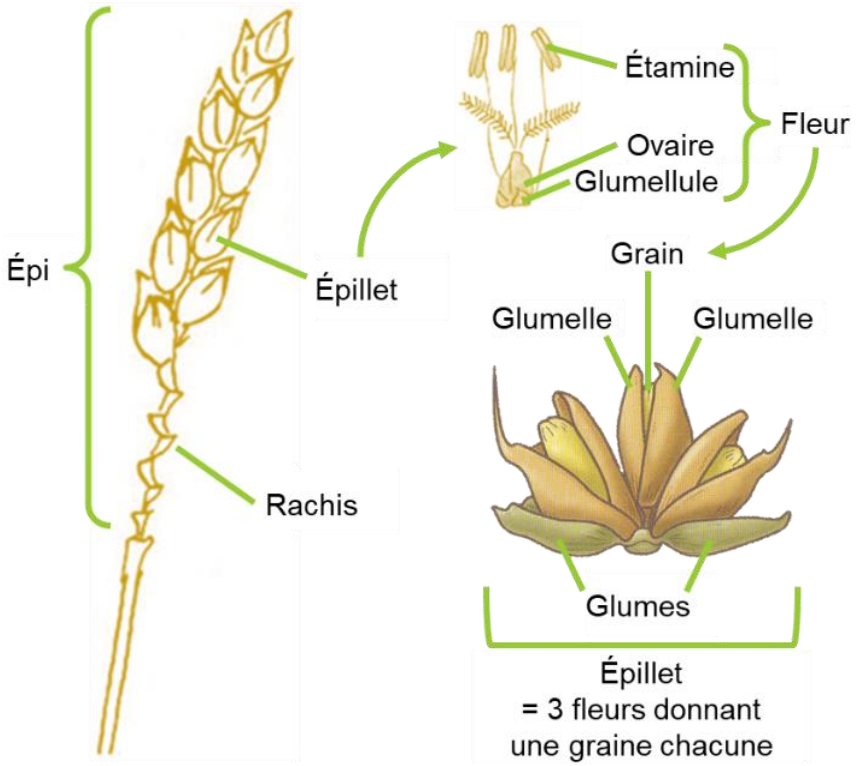


Figure II.6 : Structure de l'épi de blé et de l'épillet. Chaque épi de blé contient deux rangées d'épillets disposés alternativement de part et d'autre du rachis. Dépourvues de pétales, les fleurs de blés sont composées d'un ovaire surmonté de deux styles plumeux et trois étamines. L'ensemble est protégé par deux glumelles nommées *lemma* et *palea* (Anderson and Garlinge, 2000). A la base de chaque épillet se trouve deux glumes.

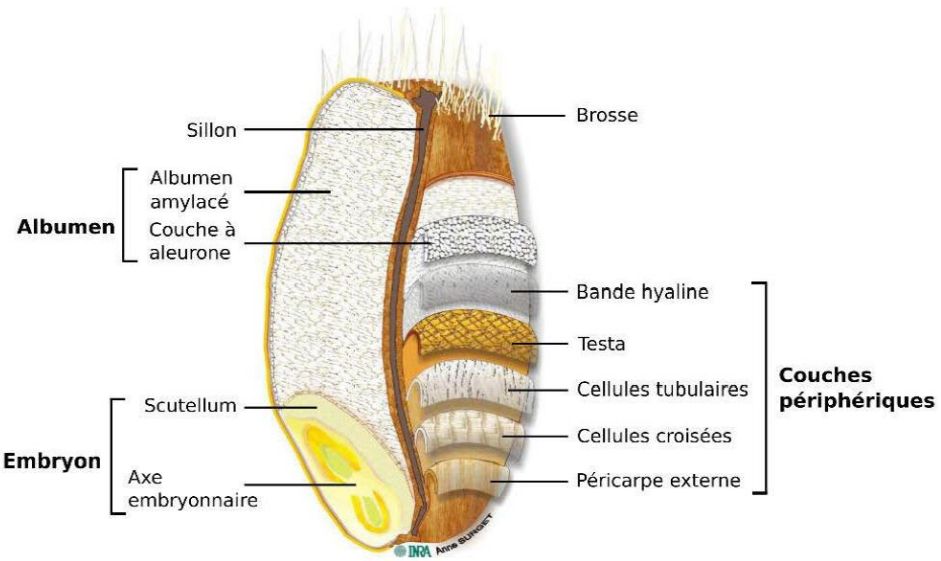


Figure II.7 : Histologie du grain de blé tendre. Le grain de blé est composé de trois principales parties : l'embryon, l'albumen et les couches périphériques (Surget and Barron, 2005).

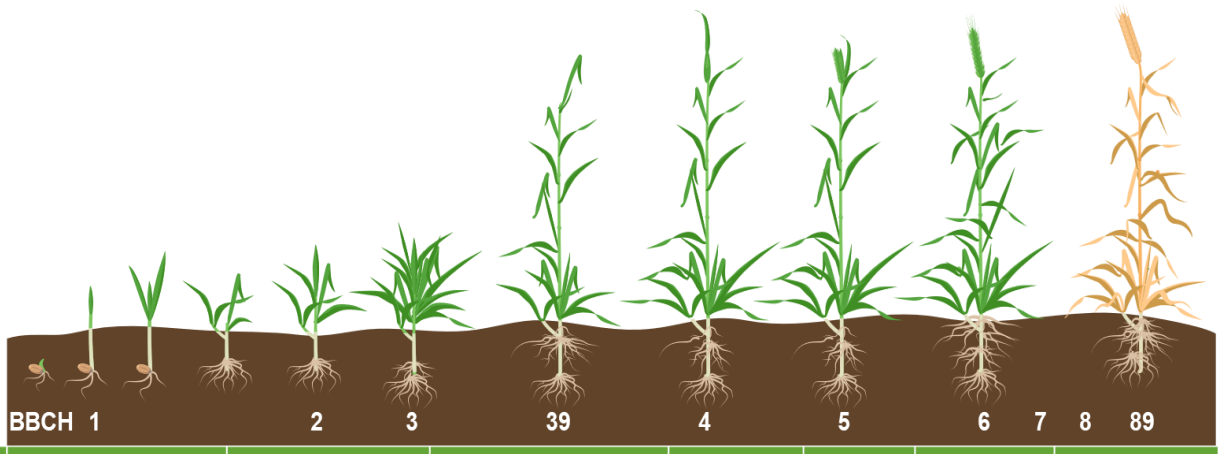
I.2.b L'épi de blé

L'épi de blé est composé de sous-entités qui sont elles-mêmes de petits épis nommées épillets (Figure II.6). Ces épillets sont disposés de manière alterne sur deux rangées opposées par rapport au rachis (l'axe central). En général, chacun de ces épillets contient trois à cinq fleurs hermaphrodites. A leur base, les épillets sont pourvus de deux glumes identiques. Les fleurs de blé n'ont pas de pétales mais sont entourées de deux glumelles (Figure II.6). La glumelle extérieure, ou *lemma,* est solide et présente une à trois arrêtes (appelées barbes dans le langage courant). La glumelle intérieur, *palea*, est quant à elle dépourvue d'arrêtes puisqu'elle est membraneuse. A l'intérieur, la fleur se compose d'un ovaire surmonté de deux styles plumeux et trois étamines (Figure II.6). Il s'agit d'une fleur cleïstogame, c'est-à-dire que le pollen mature est libéré avec son ouverture. Ainsi, le blé tendre s'autoféconde puisque son mode de reproduction à une dominance autogame.

I.2.c Le grain de blé

Le grain de blé est un fruit sec indéhiscent que l'on nomme caryopse. Il se compose de l'embryon, de l'albumen et des couches périphériques (Figure II.7) qui représentent respectivement environ 3%, 83% et 14% de la masse sèche du grain (Barron et al., 2007). L'embryon est constitué du scutellum ou cotylédon qui constitue une zone d'échange avec l'albumen (Evers and Millar, 2002). Ce dernier correspond aux tissus de réserve ; il est composé de l'albumen amylacé ainsi que de la couche à aleurone qui assure un rôle nourricier et protecteur. En effet, au cours de la germination, les gènes d'enzymes hydrolytiques de ces cellules s'activent lorsque le grain est suffisamment imbibé. Ces enzymes digèrent les parois cellulaires de l'albumen afin de mobiliser les réserves permettant la croissance de l'embryon (Sabelli and Larkins, 2009). Les couches périphériques sont au nombre de cinq (Figure II.7). De l'intérieur vers l'extérieur, il s'agit de la bande hyaline, de la testa, des cellules tubulaires, des cellules croisées et enfin du péricarpe externe.

Le grain est principalement composé d'amidon (environ 65-70%), de protéines (entre 10 et 15% en général) et d'eau (environ 15%). A cela s'ajoute lipides, pentosanes, cellulose et divers éléments (notamment fer, zinc et soufre) qui ont un rôle important dans la nutrition humaine (Khokhar et al., 2018). L'amidon est situé dans l'albumen amylacé où il est stocké dans les amyloplastes. Il s'agit de la principale source d'énergie pendant la phase de germination. Les protéines s'accumulent dans tous les tissus mais à des teneurs différentes.



Stade	Levée		Tallage		Montaison - DFE		Gonflement	Epiaison	Floraison	Maturité	
Herbicide			Antigraminées, antidicotylédones								
Fongicide				Oïdium, piétin verse, septoriose, rouilles, fusariose							
Insecticide							Cécidomyies, pucerons, tordeuses…				
Fertilisation					Fertilisation azotée fractionnée en plusieurs apports						
Calendrier	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août

<u>Figure II.8</u> : Stade de développement du blé selon l'échelle BBCH (Lancashire et al., 1991) et itinéraire technique simplifié du cycle du blé tendre d'hiver. BBCH 1 correspond à la levée du blé, BBCH 2 au tallage, BBCH 3 à la montaison, BBCH39 à DFE (dernière feuille étalée), BBCH 4 au gonflement de l'épi, BBCH 5 à l'épiaison, BBCH 6 à la floraison, BBCH 7 au développement des grains et enfin BBCH 8 à la maturation des grains.

Elles sont généralement plus fortement accumulées dans l'embryon et la couche à aleurone. Les pentosanes sont des polysaccharides non amylacés qui composent les parois cellulaires de l'albumen. Par ailleurs, les fibres représentent environ 2 à 3% de la matière sèche du grain alors que les autres constituants du grain peuvent être considérés comme mineurs. Même si les micronutriments sont par définition présents à des faibles teneurs dans la graine de blé, ils ont un rôle essentiel pour la nutrition humaine (Gharibzahedi and Jafari, 2017). Certaines carences en micronutriments telles que le zinc, le manganèse et le fer sont récurrentes chez certaines populations (Ciccolini et al., 2017; Qiao et al., 2019). C'est pourquoi, dans certains pays, d'importants programmes de recherches ont été mis en place afin de renforcer la teneur en micronutriments du blé (biofortification) et/ou de diminuer la présence des phytates, composés riches en phosphate qui constituent un antinutritionnel susceptible de chélater certains nutriments (Ficco et al., 2009; Maryami et al., 2020). L'équilibre de tous ces composés définit l'aspect qualitatif du grain qui sera décrit plus amplement au chapitre I.4.

I.3 Cycle de développement et itinéraire technique du blé

Le blé tendre se développe selon deux grandes phases. Une première phase végétative qui correspond à la production de feuilles, de tiges et de racines. La seconde phase est reproductive ; elle aboutit à l'apparition d'un épi portant des fleurs, à la formation et la maturation des grains. Une échelle internationale de notation des stades phénologiques des grandes cultures dont le blé tendre a permis de normaliser l'évaluation des stades clés de développement (BBCH, Figure II.8, Lancashire et al., 1991). Les blés d'hiver et les blés de printemps se différencient par l'initiation de la transition entre la phase végétative et la phase reproductive. En effet, le blé d'hiver a besoin de passer une partie de son développement dans des conditions environnementales hivernales afin de pouvoir fleurir. Cette période de froid et de jours courts correspond à la vernalisation. Le blé d'hiver est ainsi semé à l'automne, vernalise au cours de l'hiver pour fleurir au printemps. A l'inverse, le blé de printemps n'a pas besoin de cette période de vernalisation ; la transition florale est induite lorsqu'un nombre de feuilles déterminé a été mis en place. Ce phénomène peut parfois être régulé par la photopériode.

Plus couramment cultivé en France, le blé d'hiver est semé en octobre-novembre pour que la graine lève avant les périodes de froid (Figure II.8). Ensuite, le blé produit ses différentes talles durant l'hiver (de décembre à février) pour laisser place à une parcelle bien recouverte

Table II.1 : Grille de classement qualitatif des blés français. Les blés sont classés en quatre catégories Premium, Supérieur, Medium et Access en fonction de la teneur en protéines, de la force boulangère W, du poids spécifique et de l'indice de chute de Hagberg (FranceAgriMer et Arvalis-Institut du Végétal, 2017).

Classes	Taux de protéines (N x 5,7)%MS	Force boulangère (10^{-4} joules g^{-1})	Poids spécifique (kg hl^{-1})	Indice de chute de Hagberg (secondes)
Premium	≥ 11,5	≥ 170	≥ 77	≥ 240
Supérieur	≥ 11	Non spécifié	≥ 76	≥ 220
Médium	≥ 10,5	Non spécifié	Non spécifié	≥ 170
Access	Spécifié au contrat	Non spécifié	Non spécifié	Non spécifié

au début du printemps. En mars arrive un stade clé, le moment où l'épi mesure un centimètre dans la tige. Celui-ci progresse dans la gaine durant la phase de montaison jusqu'à sa sortie ; c'est l'étape de l'épiaison (mai-juin). Enfin, une fois la formation des organes floraux terminée, la floraison lance le début du développement des grains qui atteignent leur maturité quelques semaines plus tard.

Afin que tout ce cycle se déroule dans les meilleures conditions, différentes interventions sont réalisées en agriculture conventionnelle pour répondre aux besoins du blé et ainsi atteindre un haut niveau de production (Figure II.8). Ainsi, une lutte contre les adventices est engagée durant la phase hivernale par l'utilisation d'herbicides. Cela permet notamment de maximiser la levée et d'optimiser le nombre de pieds par mètre carré, premier paramètre de l'élaboration du rendement. Ensuite, le blé est sujet à de nombreuses maladies et insectes durant son développement. L'application de différents fongicides et insecticides reste souvent nécessaire dans l'objectif de préserver le nombre d'épis par plante et le nombre de grains par épi (deux autres paramètres essentiels pour l'élaboration du rendement). Enfin, pour répondre aux besoins nutritionnels de la plante, trois à quatre apports d'azote (le chapitre II sera dédié à l'azote dans l'agriculture) sont réalisés durant le printemps (Figure II.8). Le premier apport a lieu au tallage, le second au début de la montaison (stade épi 1 cm), le troisième au stade épiaison et l'éventuel quatrième apport peut être effectué après la floraison. Toutes ces interventions ont pour objectif d'atteindre les meilleures performances agronomiques notamment en termes de rendement et de qualité du grain.

I.4 La qualité et les protéines du grain

I.4.a Les critères de qualité du grain

La teneur en protéines des grains est considérée comme un critère qualitatif majeur. En effet, la teneur et plus encore la composition des protéines des grains de blé tendre sont déterminantes pour leur usage industriel et plus particulièrement pour les débouchés de panification. Une grille de classement qualitatif des blés basée sur leur valeur technologique a d'ailleurs été mis en place dès 1999 par l'ONIC (Office National Interprofessionnel des grandes Cultures) afin de normaliser cette classification à l'échelle nationale et internationale. Les blés sont ainsi classés parmi quatre catégories en fonction de la teneur en protéines, de la force boulangère (W), du poids spécifique (PS) et de l'indice de chute de Hagberg (Table II.1).

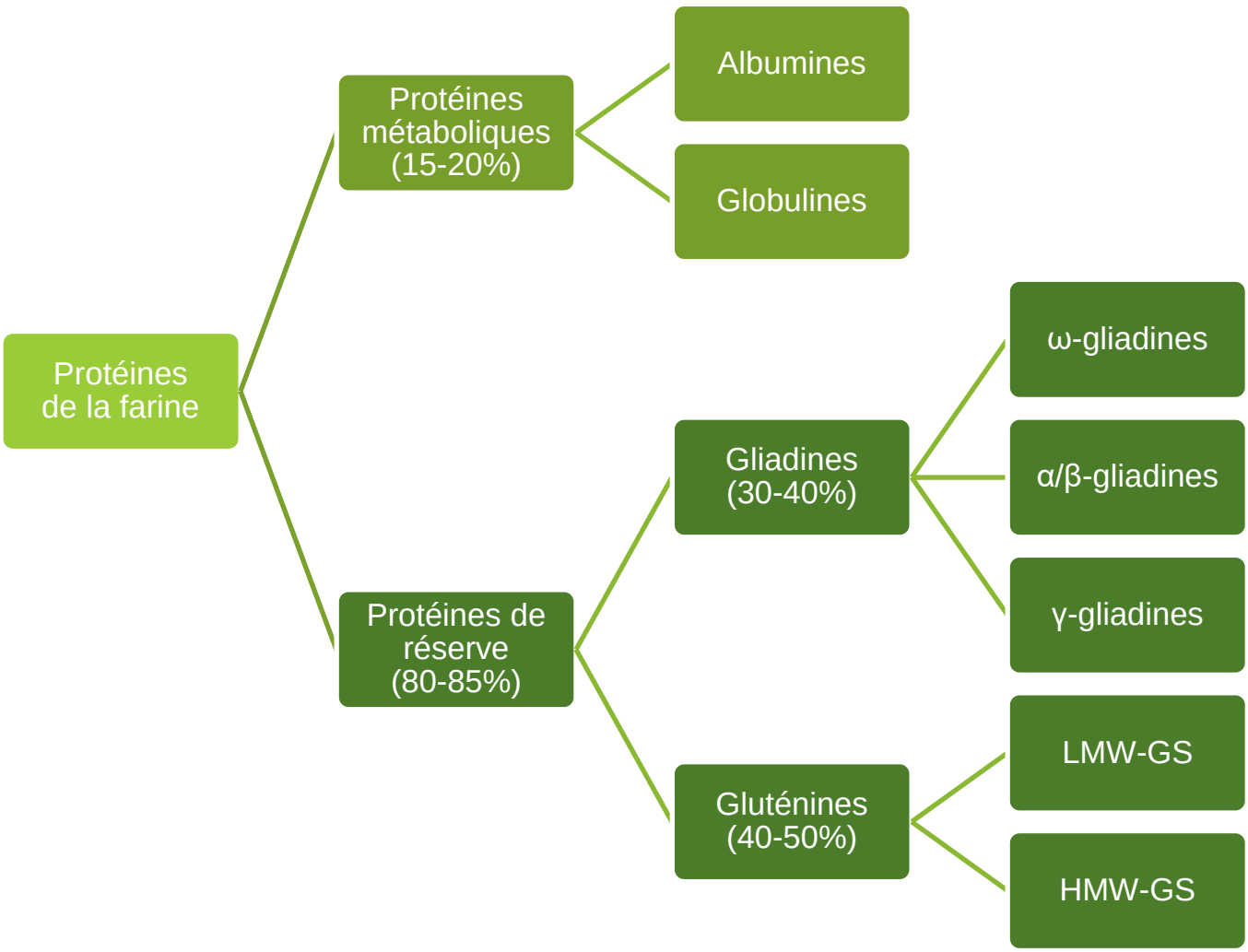


Figure II.9 : Classification des protéines présentes dans les grains de blé. La part de chaque classe est exprimée en pourcentage par rapport aux protéines totales (d'après Feillet, 2000).

Parmi les quatre critères pris en compte dans cette classification, la teneur en protéines et la force boulangère (W) sont plus directement liées aux protéines du grain. La teneur en protéines est souvent calculée à partir de la teneur en azote total des grains multipliée par un coefficient de 5,7 déterminé sur la base de la composition moyenne en acides aminés (AA) dans les protéines du grain (Table II.1, Sosulski and Imafidon, 1990). La teneur en azote du grain est le plus souvent déterminée grâce à la spectrométrie dans le proche infra-rouge (Başlar and Ertugay, 2011; Ye et al., 2018). Des teneurs en protéines élevées peuvent avoir un effet favorable en permettant une meilleure agglomération de l'amidon dans la matrice protéique présente dans le grain. Néanmoins, la teneur en protéines n'est pas à elle seule un bon indicateur pour estimer la qualité boulangère (Gabriel et al., 2017). La force boulangère W est définit par rapport à la composition du grain en différentes fractions protéiques. Cette dernière est un critère plus complexe qui représente le rapport entre l'extensibilité et la ténacité de la pâte lorsque de l'eau est ajoutée à la farine. Ce rapport détermine les caractéristiques du pain et notamment son volume, sa taille et la répartition des bulles d'air dans la mie après la cuisson. Il est mesuré grâce à un alvéographe de Chopin. Par ailleurs, le PS correspond à la masse volumique du blé ; il est exprimé en kilogramme par hectolitre (Table II.1). Ce critère est la synthèse de deux composantes : la densité de chaque grain et l'arrangement spatial des grains entre eux. Enfin, le dernier critère de classification, le Hagberg, mesure le potentiel de dégradation de l'amidon sous l'effet d'enzymes intervenant dans le processus de germination du grain. Plus l'amidon résiste longtemps à cette dégradation, meilleure est la qualité du grain (Table II.1).

I.4.b Les protéines du grain

Les protéines contenues dans les grains de blé sont réparties en différentes familles qui ont des effets différents sur les caractéristiques de la pâte. Dès 1745, les protéines du gluten ont pu être isolées. La poursuite de ce travail a permis à Osborne en 1907 de différencier deux grandes classes de protéines en fonction de leur solubilité dans l'eau ou dans des solutions salines. La première famille de protéines sont les prolamines (riches en proline et glutamine) qui correspondent aux protéines de réserve du grain et représentent 80 à 85 % des protéines totales (Figure II.9). Ces protéines sont insolubles dans l'eau ou les solutions salines. La seconde famille contient des protéines solubles ; il s'agit des protéines non-prolamines qui constituent les protéines métaboliques du grain (Figure II.9). Elles

représentent 15 à 20 % de ses protéines totales. En 1924, Osborne affine la classification selon la solubilité des protéines dans différentes solutions. Ainsi, parmi les protéines métaboliques, les albumines sont solubles dans l'eau alors que les globulines sont solubles dans les solutions salines (Figure II.9). Au sein des protéines de réserve, on distingue les gliadines (solubles dans l'éthanol à 70%) qui sont réparties en trois groupes ω-, α-/β- et γ-gliadines et les gluténines (solubles dans une base, un acide ou des détergents en présence d'un agent réducteur, Osborne, 1909, 1907). Toutes ces protéines sont classées selon leur poids moléculaire (faible, LMW-GS ; haut, HMW-GS) (Figure II.9). La quantité de protéines et la proportion de chaque classe dépend du génotype mais aussi de facteurs environnementaux. En effet, la quantité d'azote, le moment d'application, la disponibilité en azote et en soufre (Dai et al. 2015) et la température sont les principaux facteurs abiotiques influençant la structure des polymères de gluten (Malik, 2012).

I.4.b.a Les protéines de réserve

Les protéines de réserve ou prolamines (ou GSP : grain storage proteins) sont les composants principaux du gluten à l'origine des propriétés rhéologiques de la farine. Au sein des GSPs, on distingue deux fractions protéiques en fonction de leur composition. Les gliadines sont composées de monomères tandis que les gluténines sont constituées de polymères. La teneur en gliadines influence la viscosité et l'extensibilité de la pâte (Barak et al., 2013) tandis que la teneur en gluténines détermine la force et l'élasticité de la pâte (Naeem et al., 2012). Le rapport entre gliadines et gluténines, représenté par la force boulangère W, a donc des conséquences importantes sur les qualités de la farine.

Les gliadines sont des protéines solubles en solution hydroalcoolique et ont une masse comprise entre 28 et 55 kDa. Les groupes α-, β-, ω- et γ-gliadines se différencient par leurs profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide à faible pH (Shewry et al., 2003). Cette classification a été récemment précisée sur la base des séquences et compositions en AAs des gliadines. Leur poids moléculaire a aussi été pris en considération pour définir les quatre classes suivantes: ω5-, ω1,2-, α/β- et γ-gliadines (Wieser, 2007). Par ailleurs, on estime qu'il y a 75 à 450 gènes codant les α/β-gliadines, 45 à 120 codant les γ-gliadines et 45 à 60 codant les ω-gliadines (Shewry et al., 2003).

Les gluténines se classent selon deux familles ; les protéines constituées de haut à poids moléculaire allant de 67 à 88 kDa (HMW-GS) et celles à faible poids moléculaire, c'est-

à-dire entre 32 et 35 kDa (LMW-GS). Les deux familles s'organisent en larges macro-polymères au cours de la dessication du grain (Don et al., 2006). Ces grandes molécules sont stabilisées par des ponts disulfures établis entre deux résidus cystéine (Wieser, 2007). Au sein des protéines HMW-GS, on distingue deux formes x- et y- HMW-GS qui différent par leur taille et le nombre de cystéines. Les LMW-GS sont rangées dans six classes (i-, s-, m-, B-, C- et D-) différenciées par leur séquence en AAs (Johansson et al., 2013). Les LMW-GS sont codées par une famille multigénique estimée entre 30 et 40 gènes chez le blé tendre (D'Ovidio and Masci, 2004) alors que les HMW-GS sont codées par 6 gènes (Bonafede et al., 2015).

I.4.b.b Les protéines métaboliques

Les protéines métaboliques (albumines et globulines) ont peu d'effets sur les caractéristiques physico-chimiques de la pâte. Ces deux familles sont constituées d'un grand nombre de protéines ayant des fonctions diverses (protéases, hydrolases et oxydoréductases notamment). Elles jouent un rôle important dans la formation du grain, l'accumulation des réserves dans l'albumen et la dureté du grain (Vensel et al., 2005; Pauly et al., 2013). Par ailleurs, elles sont très impliquées dans les processus de germination pour fournir l'énergie et les métabolites nécessaire à une levée rapide (Wen et al., 2020). Toutes ces protéines contribuent aussi à la qualité nutritionnelle puisqu'elles possèdent un excellent équilibre en AAs essentiels et sont riches en lysine (Feillet, 2000).

L'étude de la qualité du grain et notamment des protéines spécifiques est donc d'une importance majeure. Des travaux récents reposant sur une approche protéomique ont permis de mettre en évidence l'effet de la fertilisation azotée et soufrée (Dai et al., 2015; Wen et al., 2020), de stress abiotiques (Zhang et al., 2017) et même de biostimulants (Pichereaux et al., 2019) sur le protéome du grain de blé. Avec des consommateurs de plus en plus exigeants, les modes de production doivent viser une qualité optimale, notamment vis-à-vis du gluten (Sergi et al., 2021). En effet, la maladie cœliaque touche environ 1% de la population (Mujico et al., 2011) mais de plus en plus de personnes se sentent concernées par la sensibilité non-cœliaque (Mumolo et al., 2020). De plus, les critères de qualité sont aujourd'hui une référence pour les échanges de blé dans le monde.

I.5 Rendement et qualité du grain : deux paramètres indissociables

I.5.a Des variables interconnectées

Le rendement et la teneur en protéines sont deux critères dépendant de différents paramètres physiologiques. Le rendement est la masse de grains produits par unité de surface. Il est en général calculé selon l'équation suivante :

(1) Rendement = Nombre d'épis par m² x Nombre de grains par épi x PMG / 1000
où le PMG est le Poids de Mille Grains.

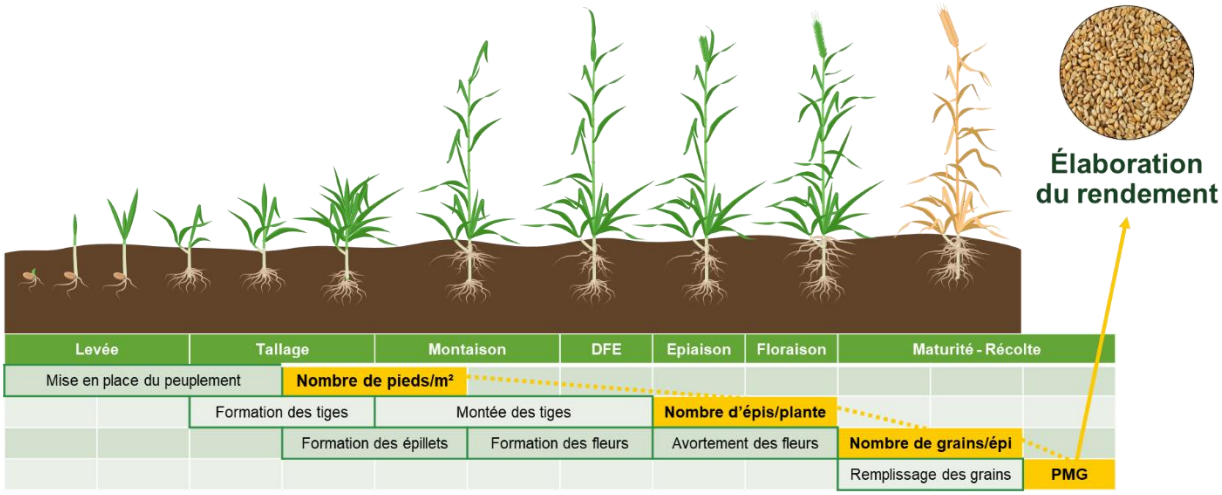
D'autre part, la teneur en protéines est le rapport entre la quantité de protéines dans le grain et le rendement. Cette teneur est donc fortement liée à la biomasse du grain et pas uniquement à la capacité de la plante à accumuler des protéines. Elle se calcule selon l'équation suivante :

(2) Teneur en protéines = quantité d'azote total des grains x 5,7 / MS totale des grains
où 5,7 est le coefficient de conversion d'azote en protéines et MS est la biomasse sèche totale des grains.

A travers ces deux équations, on peut distinguer les différentes composantes du rendement et de la qualité du blé. Un diagnostic de chacune de ces composantes facilite la compréhension des variations de rendement. Néanmoins, toutes ces composantes sont souvent sujets à des effets de compensation. En effet, si une composante est plus faible à un certain stade de développement, d'autres composantes peuvent compenser cette défaillance dans la suite du développement. Cette plasticité du blé limite les effets des aléas intervenant au cours du cycle sans pour autant atteindre les niveaux de rendements et de qualité espérés.

I.5.b Elaboration des composantes du rendement et de la qualité du blé

Le rendement et la qualité du blé obtenue à la récolte sont dépendants des composantes qui s'établissent tout au long de son cycle de développement. Ces différentes composantes sont mises en place successivement durant la phase végétative et la phase reproductive. Elles déterminent la capacité de la plante à activer son métabolisme notamment les voies d'assimilation du carbone, de l'azote et du soufre indispensables à la production de biomasse et à la formation des protéines à travers la synthèse d'AAs.



<u>Figure II.10</u> : Schéma d'élaboration du rendement du blé tendre d'hiver en fonction des stades phénologiques (d'après Arvalis-Institut du Végétal).

I.5.b.a Composantes mises en place pendant la phase végétative

La période de la phase végétative est le moment où se mettent en place les parties aériennes et racinaires qui déterminent les capacités de la plante à prélever et assimiler les éléments nutritifs. En effet, le développement des parties aériennes permet d'activer l'appareil photosynthétique, la porte d'entrée principale du carbone dans la plante. D'un autre côté, le système racinaire et son architecture définissent la capacité d'absorption de l'azote et des autres minéraux indispensables à la croissance et au développement de la plante (Laperche et al., 2006).

I.5.b.a.a Surface foliaire

La densité du couvert végétal joue un rôle important pour capter le rayonnement actif pour la photosynthèse (ou PAR, Photosynthetically Active Radiation ; Gready et al., 2013) et par conséquence impacte la production de biomasse. L'apport de fertilisants azotés augmente la surface foliaire et la teneur en azote des feuilles mais aussi leur teneur en chlorophylles et en Rubisco, enzyme fondamentale de la photosynthèse qui constitue 20 à 25% de l'azote foliaire (Makino, 2011; Makino et al., 1988). D'autre part, l'ensemble de l'azote accumulé dans les parties aériennes au cours du développement est potentiellement remobilisable lors du remplissage du grain. En effet, l'azote du grain provient majoritairement des feuilles et des tiges. Or, le rendement et la qualité des grains récoltés sont intimement liés à la teneur en azote des feuilles quelles que soient les conditions climatiques (Makino, 2011; Triboi et al., 2006). L'amélioration de ces paramètres physiologiques notamment (1) le maintien des capacités photosynthétiques, de l'absorption (Cf. Chapitre II.2.a) et de l'assimilation de l'azote (Cf. Chapitre II.2.b) pour prolonger la durée de vie des feuilles (Dupont et al., 2006) et (2) l'optimisation de la remobilisation (Cf. Chapitre II.2.c) des réserves azotées des organes végétatifs vers les grains, a des conséquences positives sur les rendements en grain et leur qualité (Triboi, 2003).

I.5.b.a.b Nombre de grains par mètre carré

Le nombre de grains par mètre carré résulte du produit entre le nombre de plantes par mètre carré, le nombre d'épis par plante et le nombre de grains par épi (Figure II.10). Le nombre d'épis par mètre carré dépend du nombre de plantes par mètre carré et du nombre d'épis par plante (Figure II.10). La densité du couvert en sortie d'hiver du blé détermine une part importante de cette composante puisqu'elle est proportionnelle au nombre de plantes

par mètre carré. Pour avoir un couvert végétal dense au printemps, il est nécessaire d'avoir une bonne qualité de semis à l'automne ; c'est-à-dire dans un sol bien préparé, humide et tempéré afin d'optimiser la levée. Le nombre d'épis par plante est quant à lui dépendant du nombre de talles émises par chaque plantule durant la période hivernale. Néanmoins, une partie des talles produites régressent alors que d'autres continuent leur croissance et font monter leur tige (Sinclair and Jamieson, 2006). Des facteurs génétiques mais aussi environnementaux et nutritionnels tels que la disponibilité en azote (Power and Alessi, 1978) interviennent à ce stade. C'est simplement à la fin de la montaison que le nombre d'épis par plante peut être déterminé. Le nombre de grains par épi est ensuite déterminé dans les 30 jours qui précédent la floraison (Figure II.10). Le quotient photothermique, rapport entre le PAR et la température, pilote cette mise en place de façon linéaire (Abbate et al., 1995). Néanmoins, certaines fleurs ne sont pas fécondées et avortent au moment de la floraison. L'efficacité de la fructification (« fruiting efficiency », nombre de grains par unité de poids sec au stade floraison, Slafer et al., 2015) est donc cruciale. L'amélioration de la fertilité des épis est une composante qui permet d'augmenter les rendements chez le blé (Pretini et al., 2020). Ce nombre de grains par mètre carré au moment de la floraison constitue donc un bon indice de récolte puisqu'il est fortement corrélé au rendement (Bustos et al., 2013). La dernière composante à déterminer en post-floraison est le PMG (Figure II.10).

I.5.b.b Composantes mises en place pendant la phase reproductive

Le développement du grain est essentiel pour l'élaboration du rendement et la détermination de la qualité grainière. Après la floraison se met en place l'étape de la division cellulaire puis la phase de remplissage du grain intervient avant sa maturation. Les processus biologiques se succèdent durant tout le développement du grain sans être nécessairement stoppés par le début d'une nouvelle étape. Pour tenir compte des effets de la température sur le développement du grain, les différents stades sont mesurés en degrés-jours (°CJ) après la floraison (Altenbach et al., 2003).

I.5.b.b.a La phase de division cellulaire

De la floraison au stade grain laiteux (de 0 à 250°CJ), les cellules de l'endosperme se divisent et se différencient en cellules permettant de stocker l'amidon au niveau de l'albumen. La formation de l'albumen amylacé et de la couche à aleurone est alors observée. Durant ce processus, on observe une forte absorption d'eau au niveau des grains. Le nombre final de

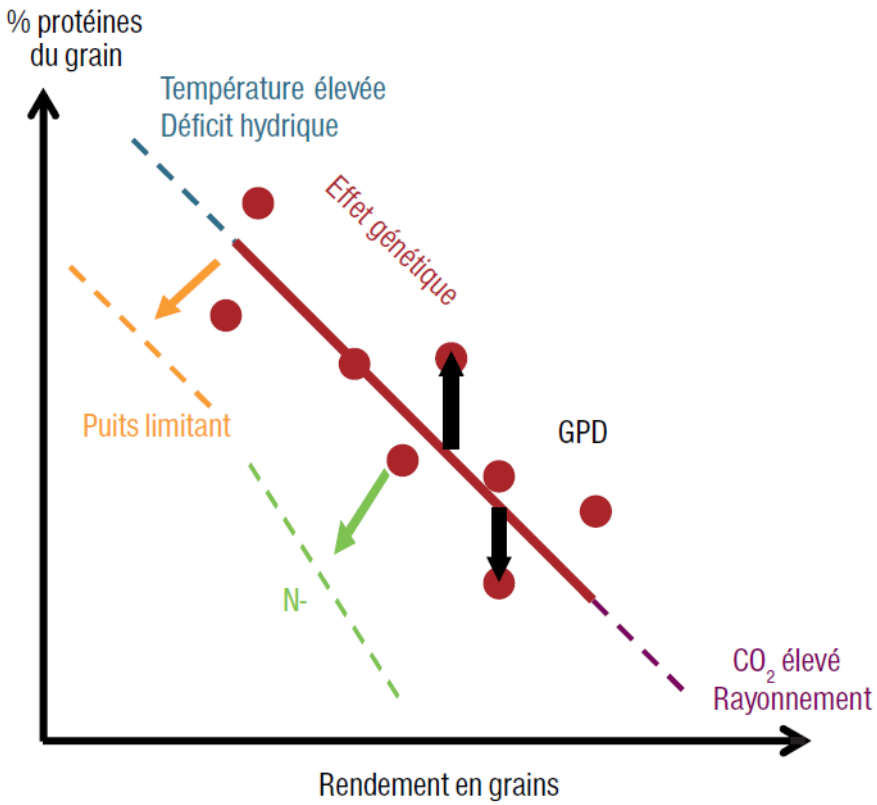
cellules qui composent l'albumen détermine le volume potentiel du grain, sa capacité de stockage et donc son PMG (Brocklehurst, 1977).

I.5.b.b.b La phase de remplissage du grain

Durant la période de remplissage du grain, de nombreuses voies métaboliques s'activent dans les feuilles notamment grâce à une nutrition azotée optimale (Heyneke et al., 2017). En effet, une importante fertilisation azotée affecte significativement 69 métabolites chez le blé tendre (Zhen et al., 2016). Les cellules des grains formées au cours de la phase précédente se remplissent d'amidon et de protéines. Leur poids en matière sèche augmente alors que la quantité d'eau stagne. Le palier hydrique est alors atteint. L'accumulation des protéines structurelles (albumines et globulines) débute dès la fécondation du grain (Triboi, 2003). Néanmoins, la phase de remplissage du grain est plutôt liée à la forte accumulation de l'amidon et des protéines du gluten qui a lieu du stade grain laiteux au stade grain pâteux. Plus précisément, l'accumulation de GSPs commence aux alentours de 150°CJ (Triboi, 2003; Dupont et al., 2006) et vers 200°CJ pour l'amidon (Dupont et al., 2006). Le rythme de l'accumulation de ces composés est maintenu jusqu'à 600°CJ (Triboi, 2003). Puis, ce processus ralentit pour s'achever aux alentours de 800°CJ (Triboi, 2003; Dupont et al., 2006). Les glucides et protéines accumulés dans les grains à cette période sont soit issus de l'activité photosynthétique post-floraison, soit de remobilisations issues des feuilles et tiges qui sénescent en fin de cycle.

L'amidon, organisé en granules (Shewry et al., 2012), détermine une grande partie du rendement puisqu'il représente 65 à 75% de la matière sèche du grain (Dupont and Altenbach, 2003). Il est composé de deux polymères qui sont l'amylose pour 30% et l'amylopectine pour 70%. L'activité photosynthétique durant la phase de remplissage du grain est essentielle car l'accumulation de l'amidon en dépend. Ainsi, la persistance de l'activité photosynthétique pendant le développement du grain favorise son remplissage en amidon. En revanche, des phénomènes tels qu'une sécheresse ou un manque d'azote durant cette période impactent négativement le remplissage et donc le PMG et le rendement en grains (Altenbach et al., 2003). Les stress thermiques sont également connus pour provoquer l'échaudage, conduisant à des grains ridés et petites tailles.

Concernant les protéines, leur accumulation a lieu dans la couche à aleurone de l'albumen mais diverge au cours du temps. Les albumines et globulines sont accumulées dans



<u>Figure II.11</u> : Facteurs génétiques et environnementaux impactant le rendement et la teneur relative en protéines du grain de blé (d'après Triboi et al., 2006). GPD: Grain Protein Deviation.

un premier temps jusqu'aux alentours de 500°CJ (Triboi, 2003). Puis, plus tardivement, les protéines de réserve (gliadines et gluténines) s'accumulent vers 800°CJ. La majorité de ces protéines provient de l'assimilation de l'azote issu de la remobilisation des réserves azotées accumulées dans les parties aériennes de la plante pendant sa croissance. Contrairement à l'amidon, l'accumulation de protéines dépend moins des facteurs environnementaux pendant le remplissage et bénéficie de phénomène de compensation entre la durée de remplissage et la vitesse d'accumulation (Dupont et al., 2006). Une réduction de la phase de remplissage n'induit pas une diminution de l'accumulation en protéines contrairement à l'amidon. Ainsi, lors de phénomènes tels que l'échaudage, les teneurs en protéines dans le grain augmentent mécaniquement.

I.5.b.b.c Maturation du grain

La dessication du grain s'opère lorsque la maturité physiologique est atteinte, c'est-à-dire juste après le stade grain pâteux. Cela entraine l'arrêt des voies métaboliques à travers le processus biologique de mort cellulaire programmée. A partir de ce moment-là, il n'y a plus de migration de glucides vers les grains et le niveau maximal d'accumulation d'amidon ainsi que le poids définitif du grain sont pratiquement atteints. En revanche, des phénomènes de polymérisation tardive des protéines peuvent apparaître pendant cette phase. Cela n'a pas d'influence sur le rendement et la teneur en protéines mais sur les propriétés boulangères de la farine (Aussenac et al., 2020). Par ailleurs, la dessication débute lentement mais très tôt pendant le développement du grain. Elle commence à partir de 16 jours après la floraison (JAF) et chevauche la phase de remplissage. Ce phénomène est le plus dynamique autour de 30 JAF et permet de fragmenter l'ADN de toutes les cellules de l'albumen amylacé (Young and Gallie, 1999). Parallèlement, la teneur en eau baisse rapidement pour se stabiliser autour de 10 à 15% d'humidité : le grain arrive alors à maturité et est prêt à être récolté.

I.5.b.c Relation négative entre rendement et teneur en protéines du grain

Chez le blé tendre d'hiver, les programmes de recherche visent essentiellement à l'augmentation du rendement. Néanmoins, un second critère d'étude s'avère aussi important puisqu'il est crucial pour la commercialisation et notamment pour l'exportation : il s'agit de la teneur en protéines. Mais il existe une forte relation négative entre le rendement et la teneur en protéines du grain (Figure II.11, Brancourt-Hulmel et al., 2003; Bogard, 2011). Cette relation négative est liée à des effets génétiques mais aussi environnementaux ainsi qu'à des

interactions entre ces deux facteurs (Figure II.11). Au niveau génétique, certaines variétés présentent un écart à la relation teneur en protéines-rendement en grains (appelé Grain Protein Deviation, ou GPD). Ainsi, certains génotypes ont un fort potentiel de rendement mais aussi une bonne teneur en protéines (Figure II.10). Au niveau environnemental, la température, l'eau et la fertilisation sont les principaux facteurs explicatifs (Malik, 2009). La température et l'accès à l'eau influencent surtout le remplissage du grain (Nadaud et al., 2015). Par ailleurs, la nutrition, et plus particulièrement la fertilisation azotée, contribue largement à l'augmentation des rendements (Hawkesford et al., 2013) et de la teneur en protéines des blés (Makowski et al., 1999). Par conséquent, la nutrition azotée, sans laquelle les niveaux de production et leur qualité s'effondreraient (Figure II.10), occupe une place primordiale dans l'agriculture actuelle. Néanmoins, le rendement n'est pas proportionnel à la dose de fertilisants azotés apportée. En effet, lors des 50 dernières années, les rendements ont été multipliés par 2,5 fois à l'échelle mondiale alors que l'utilisation d'engrais a été multipliée par 7 (FAOSTAT). Même si l'application d'engrais, notamment azotés, favorise indéniablement le développement et les performances de l'agriculture actuelle, ces chiffres indiquent que l'efficience d'usage de ces fertilisants peut être optimisée. En effet, on estime qu'uniquement un tiers des apports d'azote est finalement retrouvé dans le grain (Hawkesford and Riche, 2020).

II. L'azote dans l'agriculture

L'azote est l'un des macroéléments le plus important pour la production agricole. Dans la nature, l'azote est présent sous deux formes : à l'état libre, où il constitue 78% de l'atmosphère que nous respirons, et à l'état combiné, sous forme minérale (ammoniaque et nitrate) ou organique. Qu'il soit dans l'eau, dans le sol ou dans l'air, l'azote subit différentes transformations chimiques et biologiques qui forment un cycle naturel. Les réserves azotées du sol se trouvent à l'état organique sous forme d'humus qui contient environ 5% d'azote. L'azote représente en moyenne 1 à 5% de la matière sèche végétale. Cet élément intervient dans les principaux processus de développement de la plante et de détermination du rendement. En effet, l'azote est incorporé dans les acides aminés et il est retrouvé dans les protéines, les bases azotées et d'autres molécules telles que la chlorophylle. Il stimule la croissance racinaire, le développement des cultures ainsi que l'absorption des autres éléments nutritifs. En général, l'azote est prélevé dans le sol sous la forme de nitrate ou

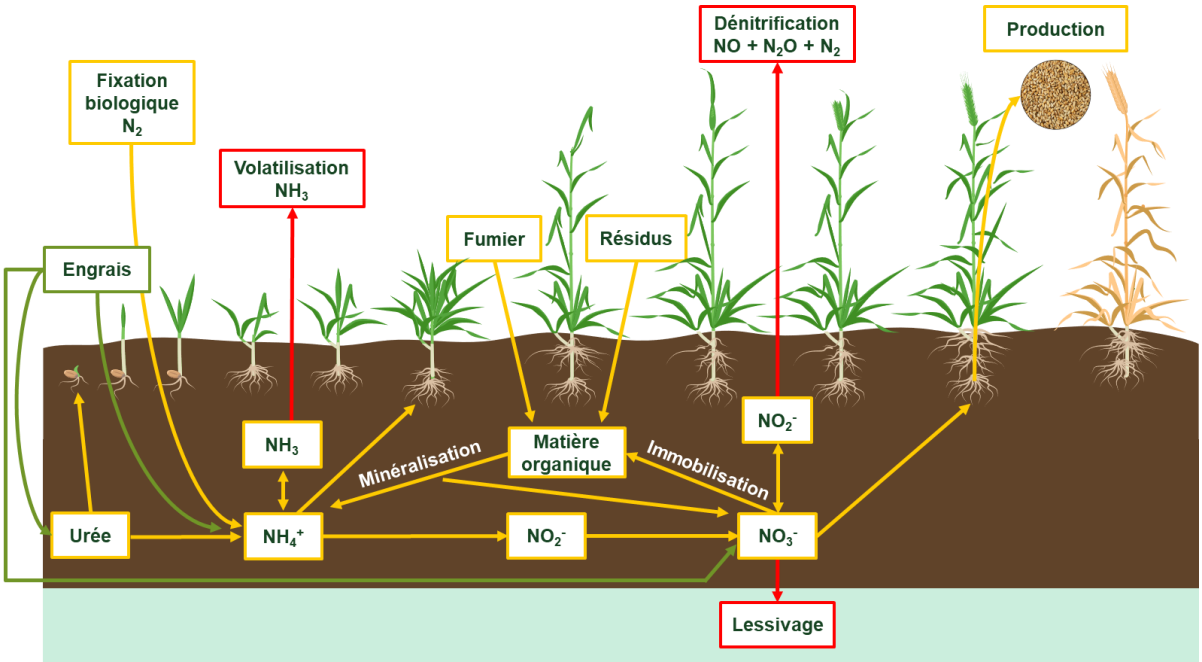


Figure II.12 : Schéma du cycle de l'azote d'après Hofman et Van Cleemput (2004).

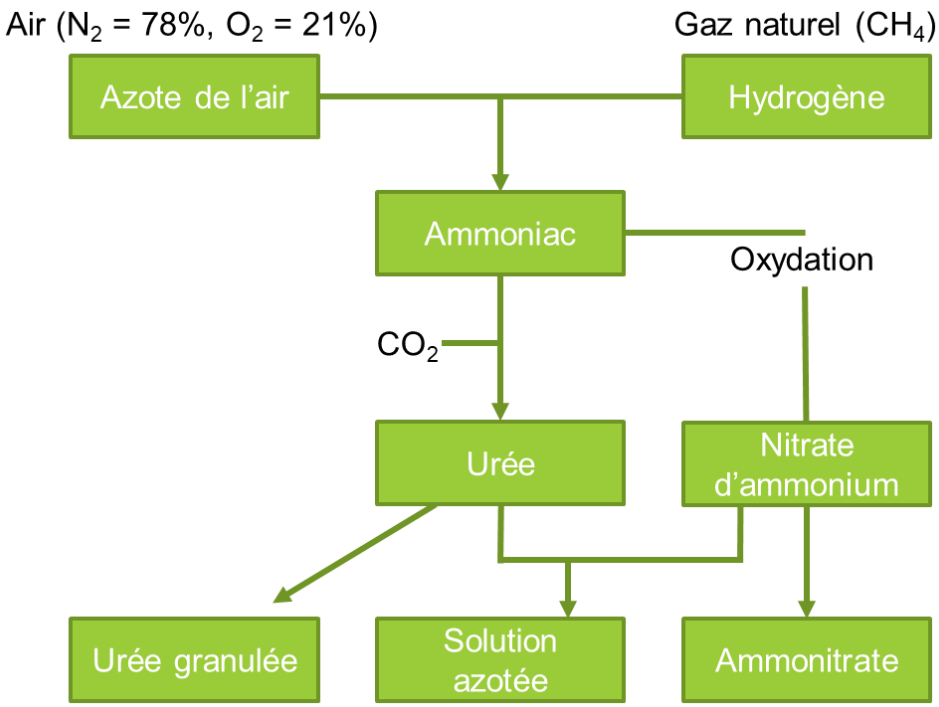


Figure II.13 : Principe de fabrication des principaux engrais azotés (UNIFA).

d'ammonium (Raven et al., 1992). L'ammonium peut être une meilleure source d'azote pour les plantes puisqu'il nécessite moins d'énergie pour être assimilé (Barraclough et al., 2014). La matière organique du sol doit être minéralisée par les microorganismes pour rendre disponible l'azote aux plantes (Figure II.12). La vitesse de ce processus dépend du type de sol et des conditions climatiques. Dans les écosystèmes naturels, ce cycle reste plus ou moins fermé puisque les apports compensent les pertes. En revanche, dans les systèmes agricoles, le cycle est perturbé par d'importantes exportations d'azote contenu dans les organes végétaux récoltés (Figure II.12). Par conséquent, l'utilisation d'engrais azotés est indispensable pour maintenir le niveau d'azote dans le milieu afin d'assurer une production agricole quantitative et qualitative (Figure II.12).

II.1 Les engrais minéraux pour la production agricole

Compte tenu des objectifs de rendement actuels, les sols ne peuvent pas fournir tout l'azote nécessaire au bon développement des plantes. Si aucune importation d'éléments nutritifs est réalisée pour maintenir les stocks, les sols s'appauvrissent et les chutes de rendements sont inévitables. L'augmentation de la productivité agricole ne peut donc avoir lieu sans l'apport d'azote grâce à l'utilisation de fertilisants, minéral ou organique, et/ou de plantes fixatrices d'azote. La fertilisation minérale est un moyen efficace de fournir aux plantes des nutriments directement assimilables. En effet, l'azote minéral d'origine industriel est à l'origine de 40% des protéines mondiales. Entre 1973 et 2017, les quantités d'azote minéral livrées ont augmenté d'un tiers passant de 1,6 à 2,2 Mt tandis que les surfaces fertilisables ont diminué de 11% (25,8 millions d'hectares en 2017). Lors de la campagne 2017/2018, la quantité totale d'azote vendue en France ramenée à l'ensemble des surfaces fertilisables était d'environ 87 kg (contre 57 kg en 1972) (UNIFA).

La fertilisation organique et minérale, la fixation biologique et les dépôts atmosphériques sont les trois possibilités d'importations d'azote au niveau du sol. La production d'engrais azotés est basée sur l'utilisation de l'azote atmosphérique pour former de l'ammoniac (NH_3, Figure II.13). Cet ammoniac entre ensuite dans la composition de fertilisants contenant de l'urée, du nitrate, de l'ammonium ou une combinaison entre ces deux ou trois formes (Figure II.13). Par ailleurs, ces formes d'azote peuvent être associées à d'autres éléments tels que le phosphore (P), le potassium (K) ou le soufre (S) pour former des engrais composés.

II.1.a L'urée granulée

L'urée se présente sous la forme de granules et contient 46% d'azote entièrement sous forme uréique. Cette forte concentration facilite sa manutention. Il s'agit d'une forme d'azote organique ($CO(NH_2)_2$) non polaire et fortement soluble. Elle est idéale pour un usage en pulvérisation foliaire ou en mélange avec d'autres fertilisants. Son utilisation par voie foliaire est optimale et facilite la gestion de la fertilisation azotée lorsque les conditions de croissance sont défavorables ou lorsque l'absorption racinaire est réduite (lors d'un stress hydrique par exemple). Néanmoins, l'urée directement absorbée au niveau foliaire peut provoquer des brûlures du feuillage et des nécroses (Gooding and Davies, 1992; Nicoulaud and Bloom, 1996). Ces symptômes de phytotoxicité sont d'autant plus sévères que la température est forte, l'humidité faible, et que la solution d'urée pulvérisée est concentrée (Krogmeier et al., 1989; Nicoulaud and Bloom, 1996). En termes d'efficacité, l'urée se rapproche de l'ammonitrate avec des résultats inférieurs mais statistiquement non significatifs. Enfin, la qualité physique de l'urée présente encore des défauts (granulométrie irrégulière et faible dureté notamment). En raison de sa forte concentration en azote et de son faible coût, l'urée représente plus de la moitié des engrais azotés appliqués dans le monde. Elle est encore plus utilisée dans les pays en voie de développement. En France, plus d'un million de tonnes d'urée ont été utilisées en 2018, soit 16,5% de part de marché (en recul de 4,5 points par rapport à 2017, UNIFA).

II.1.b L'ammonitrate

L'ammonitrate présente toujours la même composition : 50% d'azote sous forme d'ammoniac (NH_3) et 50% sous forme de nitrate (NO_3^-). Le dosage peut être de 27 ou 33,5% d'azote total. Il s'agit d'un produit très efficace puisqu'il est peu sensible à la volatilisation. Néanmoins, le prix de cet engrais est en général plus cher que les autres formes. De plus, il existe une règlementation contraignante pour les distributeurs vis-à-vis des conditions de stockage de cet engrais hautement explosif (comme l'explosion dans le port de Beyrouth nous l'a rappelé en août 2020). Le dosage entraine également des charges de manutention plus importantes en raison de sa faible concentration. Malgré ces contraintes, l'ammonitrate reste la forme d'engrais la plus utilisée en France en 2018 (2,66 Mt) bien que la tendance soit à la baisse (-2 points par rapport à 2017, UNIFA).

II.1.c La solution azotée

La solution azotée contient trois types d'engrais différents : 50% d'urée, 25% d'ammoniac et 25% de nitrate. Elle comporte 30% d'azote en massique (30 kg d'azote pour 100 kg de produit) et 39% en volumique (39 L d'azote pour 100 L de produit). L'efficience de ce produit est plus faible comparée à l'ammonitrate ; il faut majorer l'apport d'environ 10% pour atteindre les mêmes rendements et jusqu'à 18% pour combler la différence en protéines. Ceci s'explique par la volatilité plus importante du produit. Cependant, si le produit est épandu dans de bonnes conditions pour limiter les risques de volatilisation, l'écart de l'efficience se réduit par rapport à l'efficience d'utilisation de l'ammonitrate. Par ailleurs, il s'agit de la forme d'engrais la moins onéreuse du marché. De plus, il est très facile d'utiliser ce produit en pulvérisation ; la qualité de l'épandage est meilleure surtout en terme homogénéité. En revanche, il ne faut pas l'utiliser trop tardivement afin d'éviter les risques de brûlures puisqu'elle contient de l'urée. Ces avantages en font un produit de plus en plus utilisé par les producteurs français (2.34 Mt en 2018, +2,8 points par rapport à 2017, UNIFA).

II.1.d Les différentes formes minérales dans le sol

L'efficacité des différents fertilisants minéraux dépend des échanges d'ions dans le sol. L'ammonium, avec sa charge positive, est adsorbé par les colloïdes du sol chargés négativement. Cet ion est donc rapidement fixé sur les argiles et la matière organique. Lorsqu'il est libéré dans la solution du sol, l'ammonium est soit absorbé par les plantes, soit pris en charge par les bactéries du sol pour lui faire subir le processus de nitrification, aboutissant à son oxydation en nitrate (Figure II.12). Par ailleurs, l'ammonium apporté peut être perdu par volatilisation dans l'atmosphère (Figure II.12). En effet, l'ammonium est en équilibre chimique avec l'ammoniac. Cet équilibre se déplace vers l'ammoniac notamment dans les sols alcalins ce qui peut engendrer d'importantes pertes (15% pour l'urée en moyenne par exemple) (Cf. Chapitre II.3.b).

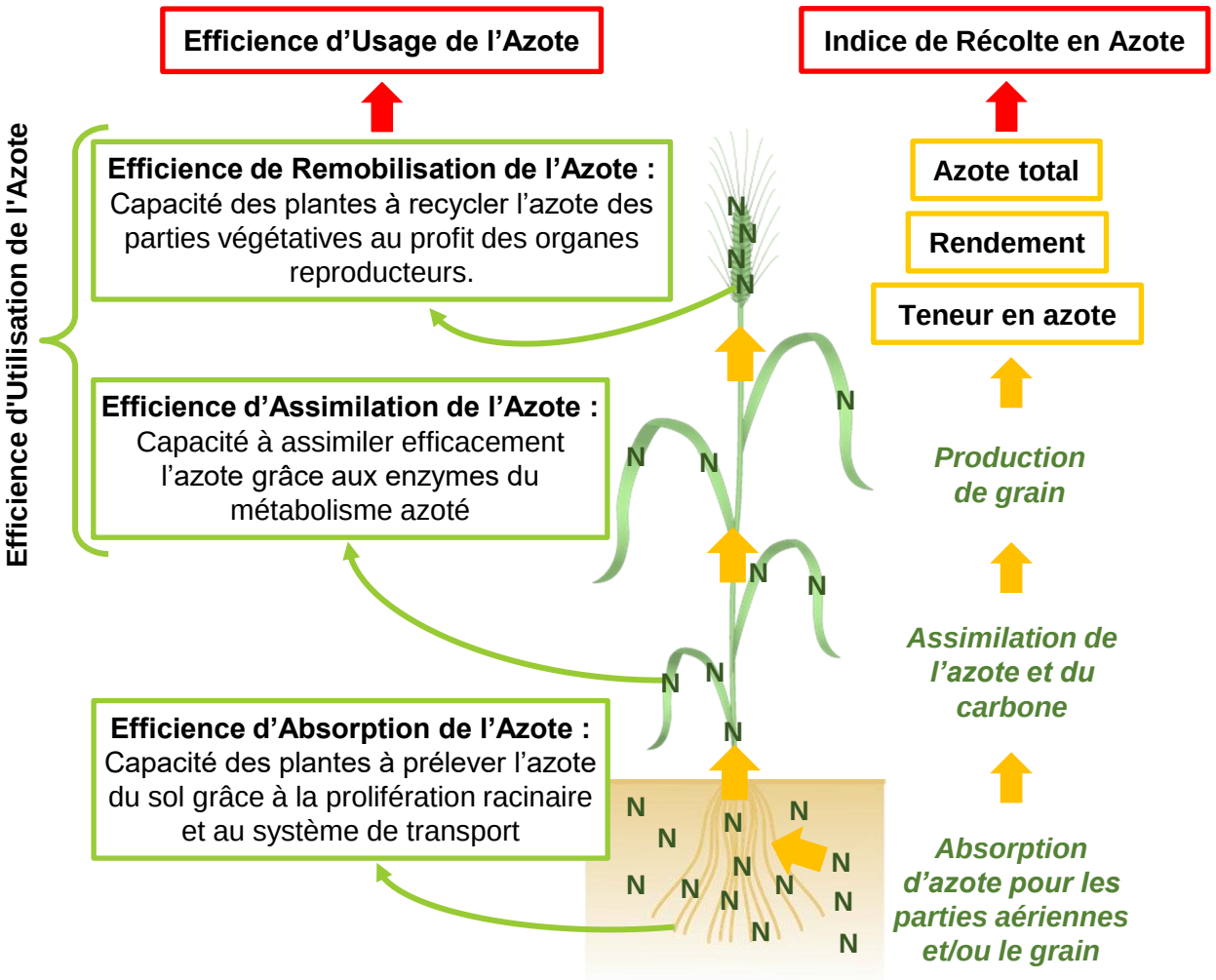
A l'opposé de l'ammonium, le nitrate porte une charge négative. Il n'est donc pas retenu par les colloïdes mais reste dans la solution du sol. C'est d'ailleurs pour cela qu'il est facilement lixivié lors de la période hivernale notamment (Figure II.12). En outre, le nitrate est aisément véhiculé par flux de masse jusqu'aux racines du fait de sa solubilité. Il s'agit d'ailleurs de la forme d'azote la plus absorbée par les plantes. Mais le nitrate peut également subir le processus de dénitrification et ainsi être réduit en oxydes d'azote (NO et N_2O, Figure II.12).

Enfin, l'urée, molécule organique largement présente dans le milieu naturel, peut être assimilée après son hydrolyse en ammonium et en dioxyde de carbone (Figure II.12). En général, les plantes prélèvent principalement l'ammonium et le nitrate issus de la dégradation de l'urée dans le sol. Son absorption directe et son hydrolyse *in planta* sont reconsidérées depuis la découverte de transporteurs spécifiques (Cf. Chapitre II.2.a.c). Des essais en conditions contrôlées, afin d'éviter toute conversion de l'urée dans le milieu, ont démontré la capacité des plantes à absorber, assimiler et utiliser l'azote uréique pour leur croissance. Néanmoins, une nutrition uréique stricte engendre une diminution de la croissance et l'apparition de symptômes (Merigout et al., 2008). L'urée est par ailleurs très sensible à la volatilisation puisqu'elle peut être transformée en ammoniac lors de son hydrolyse en ammonium (Figure II.12). Puis, après nitrification, le nitrate obtenu peut être dénitrifié et produire des oxydes d'azote. Il s'agit du fertilisant le plus controversé d'un point de vue environnemental.

L'équilibre entre ces différentes formes dépend des caractéristiques physico-chimiques du sol. Dans les sols alcalins, le nitrate est généralement plus abondant que l'ammonium puisque la nitrification est rapide. La situation est différente dans les sols acides car le processus de minéralisation peut être bloqué. Selon la température, une nutrition mixte est souvent présente avec des proportions qui varient en fonction des espèces végétales, de la microflore du sol et des conditions environnementales. Face à ces fluctuations de la disponibilité des différentes formes d'azote présentes dans le sol, l'efficience d'usage de l'azote et ses différentes composantes peuvent être fortement impactées notamment chez le blé.

II.2 L'efficience d'usage de l'azote et ses composantes

L'Efficience d'Usage de l'Azote (EUA ou NUE pour Nitrogen Use Efficiency) peut être définit comme le produit de l'Efficience d'Absorption de l'Azote (EAbA ou NUpE pour Nitrogen Uptake Efficiency) et de l'Efficience d'Utilisation de l'Azote (EUtA ou NUtE pour Nitrogen Utilization Efficiency) par la plante (Avice and Etienne, 2014; Barraclough et al., 2010; Masclaux-Daubresse et al., 2010). L'EUA est extrêmement complexe puisqu'elle est liée à des interactions entre des facteurs génétiques et environnementaux (Hawkesford and Riche, 2020; Xu et al., 2012).



<u>Figure II.14</u> : Composante de l'efficience d'usage de l'azote (d'après Hawkesford and Riche, 2020).

Première composante de l'EUA (Figure II.14), l'efficience d'absorption de l'azote (EAbA) est définie comme le niveau d'azote absorbé par la culture en fonction de l'azote disponible. A l'échelle du champ, cela inclue les fertilisants, l'azote du sol, l'azote atmosphérique et ses dépositions. Dans des conditions tempérées avec des rendements de 10 tonnes de grains par hectare, l'azote total absorbé est d'environ 250 kg ha^{-1} (Barraclough et al., 2010). Comme l'absorption de l'azote a lieu durant tout le cycle du blé (Hawkesford, 2017), la surexpression des gènes codant pour les familles de transporteurs d'urée, de nitrate, d'ammonium et d'AAs est une cible clé pour améliorer la capacité d'absorption d'azote chez le blé (Buchner and Hawkesford, 2014). La caractérisation et la sélection de blés avec des architectures racinaires facilitant l'absorption d'azote est une autre approche à considérer (Figure II.14). Le tallage influence aussi la prolifération des racines et l'allocation de la biomasse (Allard et al., 2013).

Par ailleurs, l'efficience d'utilisation de l'azote (EUtA) pour le grain est définie comme le rendement en grain par unité d'azote absorbée (Hawkesford, 2017). L'EUtA est la résultante de deux autres composantes, à savoir l'Efficience d'Assimilation de l'Azote (EAA ou NAE pour Nitrogen Assimilation Efficiency) et l'Efficience de Remobilisation de l'Azote (ERA ou NRE pour Nitrogen Remobilization Efficiency) (Figure II.14). L'indice de récolte d'azote est quant à lui la fraction d'azote présente dans le grain divisé par l'azote total absorbé (Figure II.14). Chez les nouvelles variétés de blé, cet indice est élevé, varie peu et semble insensible aux apports d'azote (Barraclough et al., 2010). En effet, l'azote du grain est principalement issu du processus de remobilisation, particulièrement efficace chez les variétés modernes. Néanmoins, cette ERA peut être influencée par des facteurs environnementaux ou en sélectionnant des génotypes en fonction l'initiation de leur sénescence (Barbottin et al., 2005).

Enfin, la teneur en protéines des grains est sous la dépendance des différentes composantes de l'EUA. L'augmentation de l'efficience de remobilisation de l'azote semble être la meilleure stratégie puisqu'elle n'a pas de conséquence négative sur le rendement mais permet d'améliorer la teneur en protéines du grain (Uauy et al., 2006). Le traçage isotopique de l'azote (^{15}N) permet de suivre précisément les flux d'azote provenant de l'engrais apporté et de déterminer l'importance de chaque composante de l'EUA (Liang et al., 2020; Salon et al., 2014). Cette approche permet notamment d'évaluer l'efficacité des pratiques de fertilisation

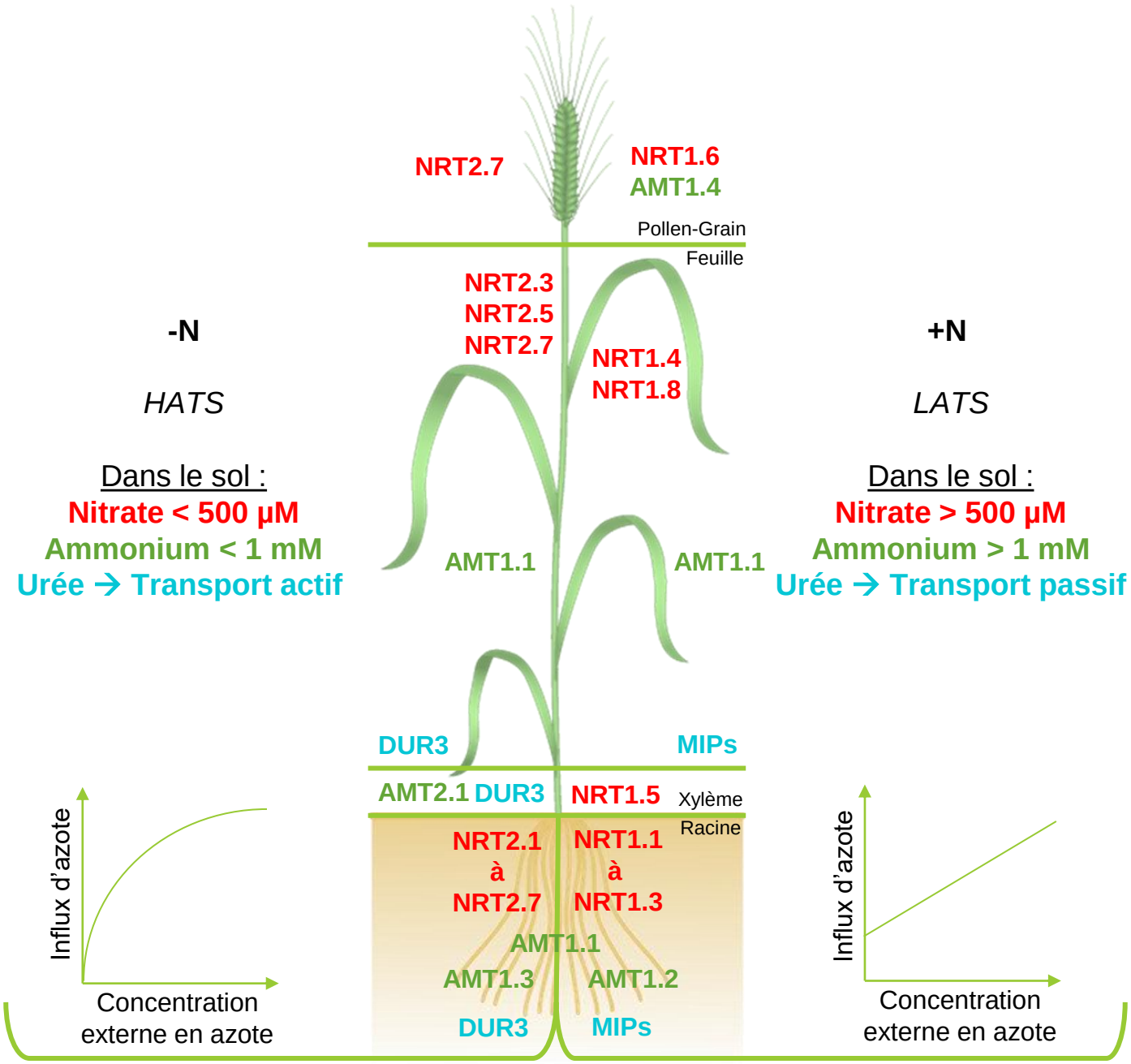


Figure II.15 : Localisation des principaux transporteurs d'azote mis en jeux selon la concentration en azote du sol.

en termes de bilan agro-environnemental en connaissant la part de fertilisants azotés qui reste dans l'environnement et celle qui est réellement absorbée et utilisée par la culture.

II.2.a Efficience d'Absorption des différentes formes d'azote

L'efficience d'absorption de l'azote est régulée par des mécanismes à l'échelle physiologique et moléculaire. Au niveau moléculaire, tous les gènes impliqués n'ont pas encore été caractérisés chez le blé. En revanche, de nombreuses recherches ont été réalisées sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Elles ont permis de comprendre précisément les processus impliqués dans l'absorption de l'azote (Miller et al., 2007; Tsay et al., 2007; Glass, 2009; Masclaux-Daubresse et al., 2010). Une partie des caractéristiques identifiées chez *A. Thaliana* peut être transposée au blé tendre même si cela n'exclut pas des différences ponctuelles.

II.2.a.a Absorption du nitrate

Le blé absorbe préférentiellement l'azote sous forme de nitrate lorsqu'il est en conditions de sol aérobie (Maathuis, 2009). L'absorption du nitrate intervient essentiellement au niveau des cellules racinaires jeunes et des poils absorbants. En effet, elle est deux à trois fois plus élevée dans les quatre premiers centimètres après l'apex racinaire que dans le reste de la racine. Néanmoins, des gènes de transporteurs de nitrate sont exprimés dans les parties matures, ce qui suggère qu'elles participent également à l'absorption (Nazoa et al., 2003). Par ailleurs, les plantes ont la capacité de moduler leur architecture racinaire en fonction de la concentration en nitrate de la solution du sol (Melino et al., 2015). Elles inhibent ou activent la croissance de leurs racines latérales en fonction de la teneur en nitrate du sol afin de prospecter les zones les plus intéressantes (Malamy and Ryan, 2001).

II.2.a.a.a Au niveau physiologique

L'absorption racinaire de nitrate nécessite des apports énergétiques issus du métabolisme du carbone. Le système d'absorption repose sur deux systèmes différents en fonction de la concentration en nitrate dans la solution du sol (Figure II.15) :

- Un système de transport à basse affinité appelé LATS (« Low Affinity Transport System ») qui intervient lors de fortes concentrations externes en nitrate (> 500 µM, Figure II.15). Il présente une cinétique linéaire en fonction de la concentration en nitrate avec une saturation lente. Ce système est peu sensible à la température et aux inhibiteurs du métabolisme (Glass et al., 1990).

- Un système de transport à haute affinité appelé HATS (« High Affinity Transport System ») permettant l'absorption du nitrate lorsqu'il est présent en faible concentration (< 500 µM, Figure II.15). Il présente une saturation rapide de type Michaelis-Menten. Certains transporteurs sont constitutifs (cHATS) alors que d'autres sont inductibles par le nitrate (iHATS). Ces derniers sont caractérisés par une affinité plus faible mais une capacité d'absorption supérieure (Doddema and Telkamp, 1979). Par ailleurs, ce système est plus sensible à la température et aux inhibiteurs du métabolisme que le système LATS (Glass et al., 1990).

II.2.a.a.b Au niveau moléculaire

La famille de gènes NRT1 dirige le système LATS

Le système LATS est constitué de transporteurs appartenant à la famille des NRT1 (Figure II.15). Ce groupe multigénique contient 53 membres chez *A. Thaliana* (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Les gènes de la famille NRT1 interviennent dans les différents organes de la plante mais avec des profils d'expression différents (Tsay et al., 2007).

NRT1.1 (ou CHL1 ; Tsay et al., 1993) est le premier gène de cette famille à avoir été identifié. *AtNRT1* est principalement exprimé dans les racines (Guo et al., 2001) et rapidement induit par le nitrate chez *A. Thaliana* mais réprimé lors de carence (Lejay et al., 1999). Ce gène est aussi impliqué dans le mécanisme de perception du signal nitrate, le développement des racines secondaires ainsi que le transport de l'auxine (Krouk et al., 2010). En effet, lorsque la teneur en azote du milieu est faible, l'auxine stimule la croissance verticale de la racine afin d'accroitre l'exploration du sol (Mounier et al., 2014). Localisée sur la membrane plasmique, cette protéine à une particularité unique au sein des transporteurs : elle est bivalente quant à son affinité pour son substrat. En effet, lorsqu'elle n'est pas phosphorylée sur le résidu thréonine 101, elle a une affinité faible pour le nitrate et intervient en LATS. Mais, sous forme phosphorylée, la protéine modifie son affinité pour fonctionner comme un système HATS (Liu and Tsay, 2003). Cette protéine est donc à la fois un transporteur et un senseur de nitrate (Gojon et al., 2009). Cela lui vaut l'appellation de transcepteur.

NRT1.2 est le second gène impliqué dans l'absorption du nitrate du système LATS. Son expression est constitutive que ce soit au niveau racinaire ou foliaire (Huang et al., 1999; Okamoto et al., 2003). Ce gène participe significativement à l'absorption de nitrate mais ne semble pas impliqué dans d'autres fonctions contrairement à NRT1.1 (Krouk, 2006).

Les autres membres sont impliqués dans le transport interne du nitrate (Figure II.15). NRT1.5 serait impliqué dans le chargement du nitrate dans le xylème (Canivenc, 2005) mais aussi du potassium (Drechsler et al., 2015). D'ailleurs, il est impliqué dans le développement des racines latérales lors de carence en potassium (Zheng et al., 2016). Il est localisé dans la membrane plasmique des cellules du péricycle racinaire (Lin et al., 2008). NRT1.8 permet le déchargement du xylème au niveau des parties aériennes (Li et al., 2010). Les autres transporteurs ont des rôles bien plus spécifiques. NRT1.4 est par exemple impliqué dans le transport du nitrate dans le pétiole des feuilles (Chiu et al., 2004) alors que NRT1.6 permet le transfert du nitrate vers l'embryon (Almagro et al., 2008) (Figure II.15).

Chez le blé, les concentrations en azote du sol jouent un rôle déterminant dans l'activation des transporteurs. L'induction de *TaNRT1.1*, *TaNRT1.3*, *TaNRT1.4*, *TaNRT1.7* et *TaNRT1.8* se réalise dans les six jours après une privation en nitrate (Guo et al., 2014; Jiang et al., 2017). A cela s'ajoute une forte inhibition de l'expression du gène *TaNRT1.5* alors que le transporteur *TaNRT1.2* est abondamment transcrit. A l'inverse, lorsque la concentration en nitrate est élevée dans le milieu, les NRT1 du LATS maintiennent leur niveau d'expression (Wang et al., 2011). L'état des connaissances devrait encore évoluer dans les prochaines années puisque 16 transporteurs potentiels (homologues aux NRT1 d'*A. Thaliana*) ont déjà été proposés (Chiu et al., 2004; Buchner and Hawkesford, 2014).

La famille de gènes NRT2 pilote le système HATS

Actuellement, sept gènes appartenant à la famille NRT2 (*AtNRT2.1* à *AtNRT2.7*) ont été décrits chez *A. Thaliana* (Orsel, 2002). Ces gènes ont été regroupés en trois catégories en fonction de leur réponse à un apport de 1 mM de NO_3^-. *AtNRT2.1* et *AtNRT2.2* forment la première catégorie ; leur expression augmente jusqu'à cinq fois après 3h d'exposition puis ils sont réprimés à partir de 72 h (Girin et al., 2007). *AtNRT2.5* et *AtNRT2.6* ne sont pas induits par la présence du nitrate ; ils sont exprimés de façon constitutive. Enfin, *AtNRT2.4* et *AtNRT2.7* sont réprimés après un apport de nitrate (Okamoto et al., 2003). Tous ces gènes sont essentiellement exprimés dans les racines (Figure II.15, Orsel, 2002). Néanmoins, *AtNRT2.3* et *AtNRT2.5* s'expriment aussi dans les parties aériennes et *AtNRT2.7* est prioritairement exprimé dans les feuilles et les graines (Figure II.15, Okamoto et al., 2003; Orsel et al., 2006).

Le gène NRT2.1 occupe une place importante dans l'absorption du nitrate. En effet, le mutant *nrt2.1* diminue de 75% la capacité d'absorption du HATS qui se traduit par une teneur en nitrate amoindrie dans les feuilles (Filleur et al., 2001). NRT2.1 est le plus abondamment exprimé (Orsel, 2002) et fonctionne en étroite interaction avec la protéine NAR2, ou NRT3 (Orsel et al., 2006). Avec NRT2.2, qui intervient pour près de 30% dans l'absorption du nitrate liée au HATS (Filleur et al., 2001), ces deux gènes représentent presque la totalité de l'absorption réalisée par ce système (Filleur et al., 2001). Enfin, comme NRT1.1, NRT2.2 présenterait une double fonction de transport et de signalisation ; il est peut donc être aussi considéré comme un transcepteur de nitrate (Gojon et al., 2011).

Chez le blé, une baisse de la disponibilité en nitrate induit l'expression des transporteurs *TaNRT2.1, TaNRT2.2, TaNRT2.3* et *TaNRT2.5* alors que *TaNRT2.4* est inhibé (Guo et al., 2014; Jiang et al., 2017). Par ailleurs, lorsque la concentration en nitrate est suffisante, les gènes du système HATS (*TaNRT2.1*, *TaNRT2.2* et *TaNRT2.3)* sont réprimés (Wang et al., 2011). NRT2.1 semble déterminant dans l'absorption du nitrate pour le blé. Induit par le nitrate quel que soit sa concentration dans le milieu, il s'exprime dans les racines mais n'est pas présent dans les feuilles (Yin et al., 2007). Il semblerait qu'il s'agisse d'un gène inductible de la famille iHATS. Par ailleurs, *TaNRT2.1* a un rôle majeur dans l'absorption post-floraison du nitrate qui est cruciale pour l'élaboration du rendement en grain et de sa qualité (Taulemesse et al., 2015).

II.2.a.b Absorption de l'ammonium

II.2.a.b.a Au niveau physiologique

Comme pour le nitrate, l'absorption de l'ammonium fait intervenir les systèmes de transport LATS et HATS (Figure II.15). Le système LATS s'active quand la concentration en ammonium est supérieure à 1 mM dans le milieu (Kronzucker et al., 1996). Il s'agit d'une diffusion passive de l'ammonium qui ne nécessite pas d'énergie. A l'inverse, lorsque la teneur en ammonium est inférieure à 1 mM, le HATS prend le relai avec une cinétique de transport de type Michaelis-Menten (Glass, 2002). Il s'agit d'un transport de type uniport énergie dépendant ou symport proton dépendant (Zhengping and Cleemput, 1996).

II.2.a.b.b Au niveau moléculaire

Composée de cinq membres, la famille de gènes AMT1 est responsable du transport à haute affinité de l'ammonium (Gazzarrini et al., 1999). *AtAMT1.1* est le premier gène de ce

groupe à avoir été identifié chez *A. Thaliana* (Ninnemann et al., 1994). Ce gène contribuerait à l'absorption de l'ammonium quel que soit la concentration en substrat dans le milieu (Figure II.15, Li et al., 2016). *AtAMT1.1* est responsable de 30% de l'ammonium absorbé par les racines d'*A. Thaliana* (Kaiser, 2002; Loqué et al., 2006). Le transporteur apoplasmique *AtAMT1.2* confère 18 à 26% de la capacité d'absorption (Yuan et al., 2007) et son homologue symplastique *AtAMT1.3* environ un tiers (Loqué et al., 2006). *AtAMT1.5* représente quant à lui seulement 5 à 10% de la capacité d'absorption (Yuan et al., 2007). Enfin, *AtAMT1.4* contribue à la nutrition azotée du pollen (Yuan et al., 2009). Par ailleurs, *AtAMT1.1* est exprimé dans les racines et les feuilles alors que ces homologues *AtAMT1.2* et *AtNRT1.3* sont uniquement exprimés dans les parties racinaires (Figure II.15). Lors de carences en azote, les gènes *AtAMT1.1* et *AtAMT1.3* (Duan et al., 2018) sont surexprimés alors qu'aucun changement n'est à signaler pour *AtAMT1.2* (Gazzarrini et al., 1999; Rawat et al., 1999; Loqué et al., 2006). En effet, *AtAMT1.2* s'exprime davantage lorsque le milieu extérieur est riche en ammonium, ce qui permet une meilleure translocation vers les parties aériennes (Duan et al., 2018). Dans ces conditions, *AtAMT1.1* s'exprime alors préférentiellement dans les parties aériennes (Engineer and Kranz, 2006). Par opposition aux nitrates, le système de transport de l'ammonium serait piloté essentiellement par la concentration en azote de la rhizosphère (Gansel et al., 2001). Par ailleurs, la glutamine régule la transcription de *AtAMT1.1* dans le cadre d'un rétrocontrôle négatif (Rawat et al., 1999). Aussi, il existe une régulation réciproque entre *AtNRT2.1* et *AtAMT1.1* en fonction des sources d'azote disponibles (Gazzarrini et al., 1999; Rawat et al., 1999; Camañes et al., 2012).

AtAMT2.1 est un autre transporteur à haute affinité que l'on retrouve dans différents organes chez *A. Thaliana* (Sohlenkamp, 2002). Ce dernier est génétiquement très distant de la famille des AMT1 ; il semblerait même plus proche des transporteurs d'ammonium présents chez les procaryotes (Howitt and Udvardi, 2000). Comme ses homologues AMT1, AMT2.1 est régulé par la concentration en azote du milieu. *AtAMT2.1* jouerait un rôle important pour le chargement du xylème en ammonium et sa translocation vers les parties aériennes en coopération avec les ATM1 (Figure II.15, Giehl et al., 2017).

Chez le blé, 23 transporteurs d'ammonium potentiels ont été récemment identifiés (Li et al., 2017). *TaAMT1.1a*, *TaAMT1.1b* et *TaAMT1.3a* semblent s'exprimer davantage que les autres. En conditions *in vitro*, *TaAMT1.1* est stimulé en milieu acide (Søgaard et al., 2009).

Enfin, les travaux de Bajgain et al. (2018) révélant l'expression de 8 nouveaux gènes orthologues des AMT dans les parties racinaires et aériennes dans des plantules de blé de 21 jours montrent qu'il reste encore beaucoup à découvrir sur ces transporteurs.

II.2.a.c Absorption de l'urée

L'utilisation des engrais uréiques ne constitue pas l'unique voie d'entrée de l'urée dans les systèmes de culture. L'urée provient aussi des excrétions animales et de la décomposition des molécules azotées issues de la matière organique. Les plantes sont capables d'utiliser cette urée issue de l'environnement naturel comme source d'azote pour leur croissance. Cependant, l'urée est rapidement hydrolysée par des enzymes des microorganismes du sol. De ce fait, les concentrations en urée du sol sont souvent faibles (< 70 µM dans des sols agricoles, Becker-Ritt et al., 2007). Les plantes se sont donc adaptées et ont développé des systèmes de transport spécifiques de l'urée.

II.2.a.c.a Un transport passif de l'urée

Les protéines intrinsèques majeures (MIPs, également appelées aquaporines) assurent un transport passif de l'urée (Figure II.15). Grâce à ces protéines, les petites molécules neutres et l'eau franchissent les membranes cellulaires. Chez *A. Thaliana*, 35 MIPs réparties en 4 sous-classes ont été identifiées : les protéines intrinsèques de la membrane plasmique (PIPs), les protéines intrinsèques tonoplastiques (TIPs), les protéines intrinsèques membranaires noduline-26-like (NIPs) et les petites protéines membranaires intrinsèques de base (SIPs, Forrest and Bhave, 2007).

Grâce à un criblage génomique des transporteurs de l'urée chez *A. Thaliana*, quatre TIPs impliquées dans ces processus ont été identifiées : *AtTIP1.1*, *AtTIP1.2*, *AtTIP2.1* et *AtTIP4.1* (Liu, 2003). Ces transporteurs sont sensibles à la concentration en urée et au pH du milieu. Ces protéines sont localisées dans l'ensemble de la plante. Dans les racines, elles sont régulées au niveau transcriptionnel par le statut azoté de la plante et induites lors de carence en azote. De plus, Liu et al. (2003) ont démontré que l'expression de *AtTIP2.1* augmente de façon linéaire en réponse à des concentrations croissantes en urée dans le milieu extérieur. Cette cinétique linéaire dépendante du substrat est caractéristique d'un transport lié à un canal ionique et s'observe très souvent chez les transporteurs de type LATS.

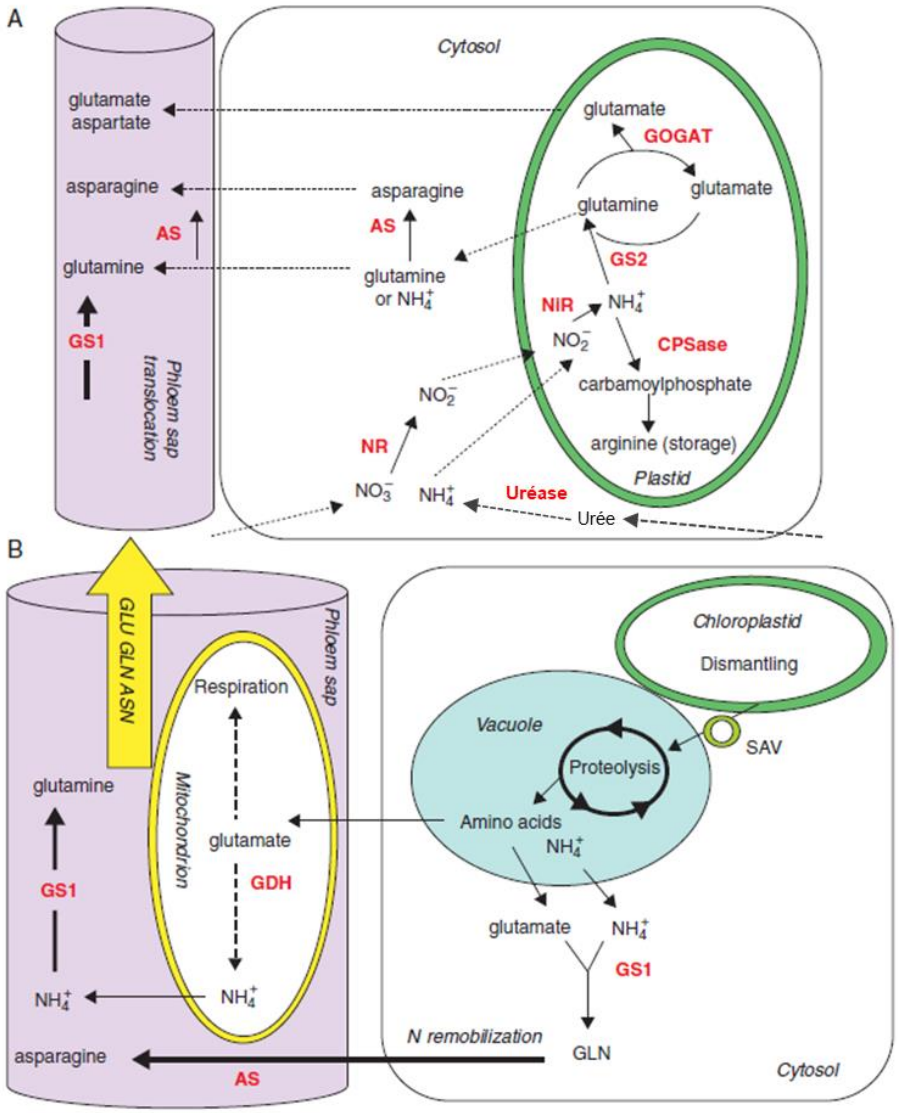
Quelques membres des familles PIPs et NIPs participent aussi au transport de l'urée notamment *AtPIP2.1* (Dynowski et al., 2008) et *AtNIP5.1* (Soto et al., 2010; Yang et al., 2015).

Les PIPs ont un canal étroit qui permet un passage lent de l'urée. Enfin, deux MIPs (At2g29870 et At2g34390) sont spécifiquement induites par l'urée au niveau des racines et des feuilles d'*A. Thaliana*. Si l'urée est la seule source d'azote présente dans le milieu, cette induction est accompagnée d'un prélèvement du substrat par les plantes (Merigout et al., 2008).

II.2.a.c.b Un transport de l'urée à haute affinité

Tout comme pour le nitrate et l'ammonium, les plantes possèdent un transporteur actif (DUR3) impliqué dans le prélèvement de l'urée (Figure II.15). DUR3 permet l'absorption de l'urée externe à la plante et son transport endogène. *AtDUR3* a été identifié chez *A. Thaliana* comme un transporteur majeur à haute affinité. Il est la première preuve de l'existence d'un transport actif H^+/urée chez les plantes (Kojima et al., 2007). Des mutants d'insertion T-DNA *AtDUR3* présentent des symptômes d'une carence azotée, une accumulation d'anthocyanes et une plus faible accumulation d'urée dans les tissus racinaires comparativement au témoin sauvage (Kojima et al., 2007). *AtDUR3* comporte 14 domaines transmembranaires. DUR3 se comporte de la même manière que NRT2 et AMT2 : il est surexprimé dans les racines mais pas dans les parties aériennes en cas de carence azotée (Kojima et al., 2007). Il est par ailleurs induit par la présence d'urée dans le milieu mais réprimé par le nitrate et l'ammonium (Merigout et al., 2008).

DUR3 est localisé dans la membrane plasmique des cellules épidermiques de la racine et s'exprime au niveau du xylème et des parties aériennes afin d'assurer le transport endogène de l'urée (Figure II.15, Kojima et al., 2007). Par ailleurs, *AtDUR3* s'exprime aussi lors de la germination ainsi que dans les feuilles sénescentes (Liu, 2003) puisqu'il est impliqué dans les processus de remobilisation et de recyclage de l'azote (Bohner et al., 2015). Malheureusement, il n'existe encore aucune donnée sur cette protéine chez le blé. Mais le séquençage récent de l'ensemble du génome du blé tendre va probablement permettre de nouvelles avancées sur l'identification de transporteurs d'urée (The International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC), 2018). En effet, la compréhension des mécanismes d'absorption des différentes formes d'azote est fondamentale pour optimiser l'efficience d'usage de ce macroélément.



<u>Figure II.16</u> : Schéma des mécanismes impliqués dans l'assimilation et la remobilisation de l'azote chez les végétaux. Dans les organes jeunes (A), les nitrates sont rapidement réduits en nitrite par les enzymes NR dans le cytosol puis en ammonium par les NiR dans les plastes. L'urée est aussi rapidement hydrolysée en ammonium grâce aux uréases. L'ammonium intègre ensuite des molécules carbonées à travers le cycle GS/GOGAT. La glutamine et le glutamate sont ainsi les deux premiers acides aminés (AA) synthétisés. Avec l'asparagine, synthétisée à partir de la glutamine grâce à l'arginine synthétase (AS), ces trois AAs se dirigent vers le phloème pour être transportés vers d'autres organes. Dans les organes sénescents (B), la protéolyse libère des peptides et des AAs qui vont conduire à la production d'ammonium et de glutamate. Ces deux molécules sont les substrats de la GS1 qui catalyse la synthèse de glutamine qui est ensuite exportée via le phloème. Dans le phloème, l'action des enzymes GS1, GDH et AS engendre la synthèse de la glutamine, du glutamate et de l'asparagine qui constituent les principaux AAs circulant dans la sève phloémienne pour alimenter les organes puits (adapté de Masclaux-Daubresse et al., 2010). CPSase, carbamoyl phosphate synthase ; SAV, senescence associated vacuole.

II.2.b Efficience d'Assimilation de l'azote

II.2.b.a Dégradation de l'urée en ammonium

Synthétisées par de nombreux organismes, les uréases (amidohydrolases urée ; E.C. 3.5.1.5) forment un groupe d'enzymes très répandues dans la nature. Elles sont aussi présentes en tant qu'enzymes libres ou liées aux particules colloïdales dans les sols agricoles. Ces enzymes permettent d'hydrolyser l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone pour que les organismes vivants puissent l'utiliser comme source d'azote pour leur développement. Cette activité enzymatique est présente dans tous les tissus des végétaux (Figure II.16.A). La principale caractéristique commune à toutes ces enzymes est la présence d'un centre métallique dans leur site actif. Ainsi, elles ont besoin de deux atomes de nickel pour pouvoir hydrolyser l'urée (Dixon et al., 1975). En cas de carence en nickel, *A. thaliana* accumule l'urée dans ses parties aériennes (Merigout et al., 2008). De plus, l'activation des uréases nécessite aussi la participation de protéines accessoires qui agissent comme des protéines chaperonnes uréase-spécifiques (Mobley et al., 1995). Quatre protéines (UreD, UreE, UreF et UreG) permettent de carboxyler un site actif de lysine et d'incorporer les atomes de nickel chez les bactéries (Mobley et al., 1995). En revanche, chez les plantes ne présentant pas de protéines UreE, UreG assurerait la fonction associée (Witte, 2005). Contrairement aux bactéries, la protéine UreG des plantes contient une extrémité N-terminale riche en résidus histidine et aspartate qui vont fixer le nickel (Witte et al., 2001). L'absence d'une de ces protéines entraine la perte de l'activité chez des mutants qui deviennent incapables de croitre si l'urée est l'unique source d'azote (Witte, 2005).

Par ailleurs, les uréases participent au métabolisme des composés azotés (Wang et al., 2008). En effet, l'urée est un intermédiaire de la dégradation de l'arginine par les arginases et de la dégradation des purines et uréides (Todd et al., 2006). L'hydrolyse de l'arginine par l'arginase (L-Arg amidinohydrolase ; E.C. 3.5.3.1) produit de l'ornithine et de l'urée dans la mitochondrie (Funck et al., 2008). Cette urée est exportée vers le cytoplasme pour être hydrolysée par les uréases en ammonium (Figure II.16.A). Ce dernier est ensuite intégré dans la voie d'assimilation de l'azote. Les uréases ont ainsi un rôle majeur dans le catabolisme de l'arginine qui est central pour la remobilisation de l'azote des tissus sources. Enfin, les uréases dégradent les uréides, principalement l'allantoïne et l'allantoate, issus du catabolisme des purines.

II.2.b.b Réduction du nitrate en ammonium

Le nitrate absorbé par la plante peut être soit stocké dans les vacuoles pour une utilisation ultérieure, soit directement assimilé en étant réduit en ammonium au cours d'un processus actif nécessitant de l'énergie. Pour cela, le nitrate subit deux étapes successives de réduction enzymatique qui conduisent à la formation de nitrite (NO_2^-) puis d'ammonium avant d'être incorporé dans des molécules carbonées (Figure II.16.A). Cette assimilation du nitrate est équilibrée entre les parties aériennes et racinaires chez le blé. La première étape de réduction du nitrate en nitrite se réalise dans le cytoplasme des cellules grâce à l'enzyme Nitrate Réductase (NR ; EC 1.6.6.1) :

$$NO_3^- + NAD(P)H, H^+ \rightarrow NO_2^- + NAD(P)+ + H_2O$$

Ensuite, la Nitrite Réductase (NiR ; E.C. 1.7.7.1) prend en charge le nitrite pour le réduire en ammonium. Cette réaction se déroule dans les plastes des racines et dans les chloroplastes des feuilles (Figure II.16.A). Dans les racines, le pouvoir réducteur est le NADPH alors qu'il s'agit de la ferrédoxine dans les feuilles :

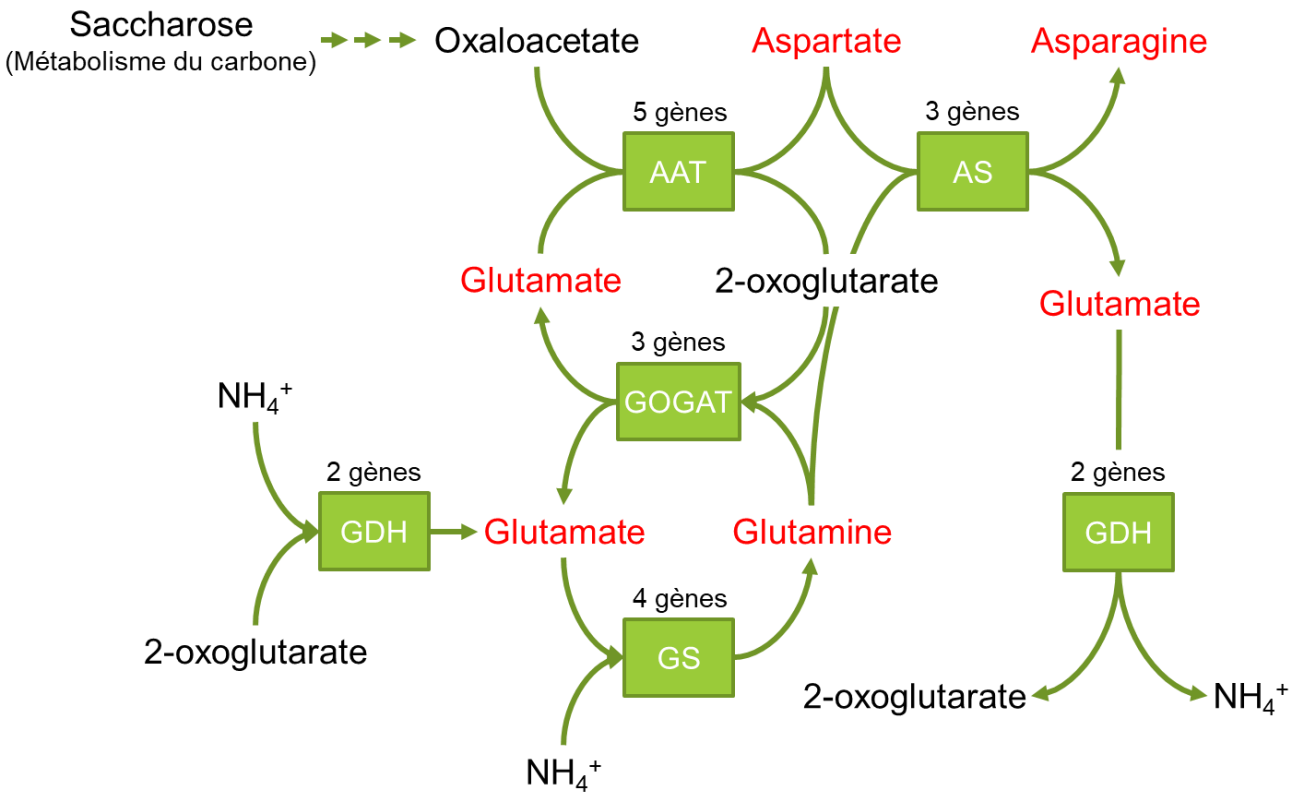
Au niveau racinaire :

$$NO_2^- + 4\ NADPH, H^+ \rightarrow NH_4^+ + 4\ NAD(P)^+ + 2\ H_2O$$

Au niveau foliaire :

$$NO_2^- + 6\ \text{ferrédoxines red.} + 8\ H_3O^+ \rightarrow NH_4^+ + 6\ \text{ferrédoxines ox.} + 10\ H_2O$$

Les gènes codant pour ces deux enzymes sont régulés de la même façon chez *A. thaliana*. Leurs homologues ont aussi été décrits chez le blé (Boisson et al., 2005). La présence de nitrate active l'expression de la NR et de la NiR. La NiR est généralement plus fortement exprimée afin de limiter l'accumulation de nitrite qui est toxique pour les plantes. L'expression des gènes codant ces enzymes est aussi régulée par la lumière *via* l'intervention des phytochromes (Lillo, 2008). La plante réagit de cette façon afin d'assurer une bonne coordination entre les métabolismes azoté et carboné. Par ailleurs, en cas d'accumulation de composés azotés tels que la glutamine, l'expression des gènes de la NR et de la NiR est réprimée ; l'activité de la NR est notamment dépendante de son état de phosphorylation (Lillo, 2008). Ainsi, la plante peut réagir rapidement aux variations de besoin en ammonium grâce à un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation des NR disponibles.



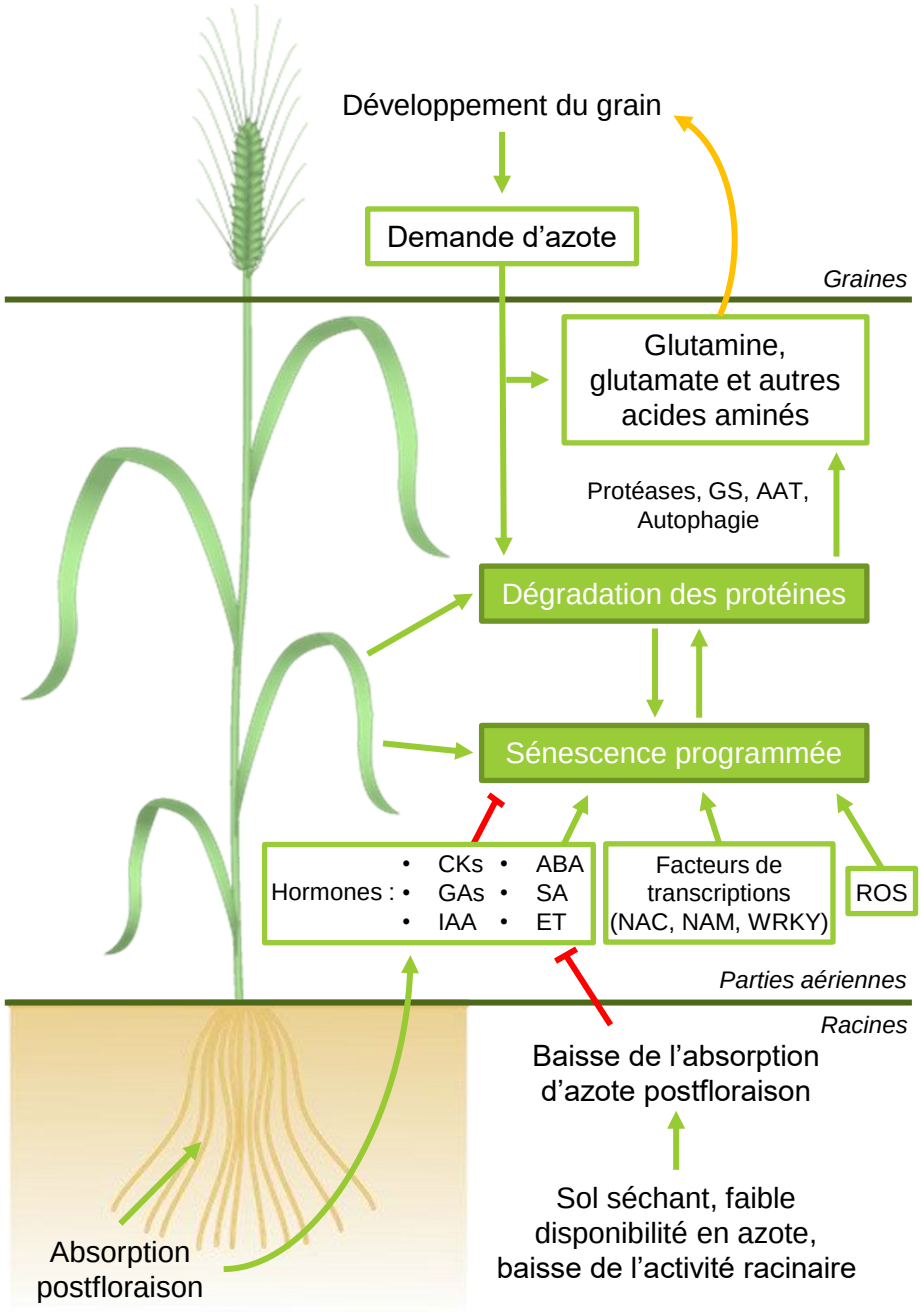
<u>Figure II.17</u> : Voie d'assimilation de l'azote. GS, glutamine synthétase ; GOGAT, glutamate synthétase ; AAT, aspartate aminotransférase; AS, asparagine synthétase ; GDH, glutamate déshydrogénase (d'après Coruzzi, 2003).

II.2.b.c Assimilation de l'ammonium

L'ammonium présent dans les plantes est donc issu de la catalyse de l'urée et de la réduction du nitrate mais également de la photorespiration et du recyclage d'AAs. L'ammonium est un composé toxique lorsqu'il s'accumule dans les cellules végétales. Son assimilation dans des molécules carbonées est donc vitale pour les plantes. Elle se réalise dans les plastes et les chloroplastes grâce à un couple d'enzymes : la glutamine synthétase 2 (GS2) et la glutamine:oxoglutarate aminotransférase (GOGAT ou glutamate synthétase) (Figure II.16.A). Il s'agit d'un mécanisme actif appelé cycle GS/GOGAT (Figure II.17). La GS2 catalyse l'amination ATP-dépendante du glutamate par l'ajout d'une molécule d'ammonium et forme ainsi la glutamine (Figure II.17). La GOGAT catalyse quant à elle le transfert d'un groupe amide de la glutamine au 2-oxoglutarate (également un intermédiaire du cycle de Krebs) afin de produire deux molécules de glutamate (Figure II.17). Une de ces deux molécules de glutamate servira à alimenter le cycle GS/GOGAT alors que l'autre est utilisée pour la synthèse d'AAs comme l'aspartate, impliquant l'enzyme aspartate aminotransférase (AAT), et l'asparagine grâce à l'asparagine synthétase (AS) (Figure II.17). Par ailleurs, l'enzyme Glutamate Déshydrogénase (GDH ; E.C. 1.4.1.2) peut désaminer le glutamate produit et libérer du 2-oxoglutarate et de l'ammonium (Figure II.17). Cette réaction intervient essentiellement pour maintenir l'équilibre entre le carbone et l'azote dans les cellules. D'autres formes de GS (E.C. 6.3.1.2, dont la GS1 cytosolique) sont impliquées dans les processus de remobilisation et de recyclage de l'azote dans les organes en sénescence et dans le phloème (Figure II.16.B).

La GS est codée par 3 à 5 gènes selon les espèces qui sont traduits en différentes protéines (GS1, GSr et GSe pour le blé) intervenant dans le recyclage de l'azote. En revanche, chez le blé comme chez toutes les espèces, un seul gène code pour la GS2 chloroplastidiale pour assimiler l'ammonium en glutamine (Bernard et al., 2008). De plus, des QTL d'efficience de l'usage de l'azote ont été colocalisés avec des gènes de l'assimilation de l'azote : MQTL-4 avec GSr et MQTL-5 avec GSe sur le chromosome 4B, MQTL-9 avec GS2 sur le chromosome 5D et MQTL-11 avec GS1 sur le chromosome 6A (Quraishi et al., 2011).

Par ailleurs, il existe deux formes de GOGAT : la Fd-GOGAT (E.C. 1.4.7.1) et la NADH-GOGAT (E.C. 1.4.1.13) qui utilisent respectivement la ferrédoxine et le NADH comme réducteur (Vanoni and Curti, 2005). La Fd-GOGAT se situe davantage dans les tissus photosynthétiques alors que la NADH-GOGAT fonctionne davantage dans les organes non-



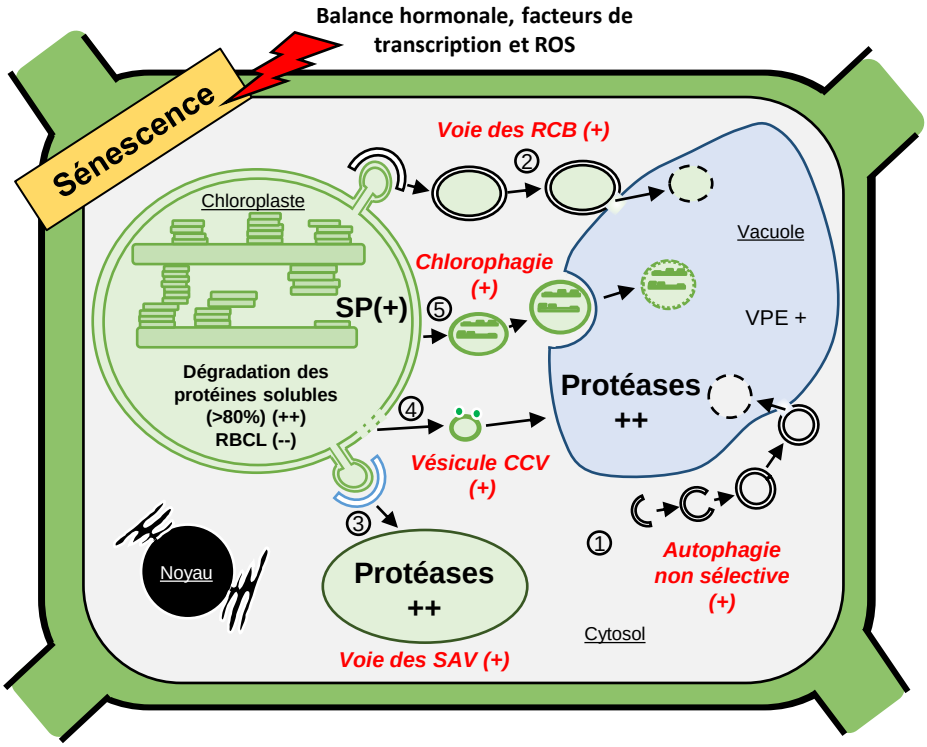
<u>Figure II.18</u> : Schéma de la remobilisation de l'azote vers le grain de blé. La remobilisation de l'azote est sous contrôle génétique et régulée par des interactions entre organes sources, organes puits, hormones (notamment l'ABA), environnement et processus physiologiques. Les flèches vertes indiquent des effets inducteurs. Les traits rouges indiquent des effets inhibiteurs. La flèche jaune indique l'exportation d'acides aminés vers le phloème et le grain durant son remplissage. CKs, cytokinines ; GAs, gibbérellines ; IAA, auxine ; ABA, acide abscissique ; SA, acide salicylique ; ET, éthylène ; ROS, reactive oxygen species (d'après Kong et al., 2016).

photosynthétiques. Le cycle GS-GOGAT est régulé par de nombreux stimuli tels que la lumière, le niveau d'ammonium et de glutamine (Lillo, 2008). Le gène de la *NADH-GOGAT* semblerait quant à lui se situer sur le chromosome 3B (Quraishi et al., 2011) tandis que le gène *Fd-GOGAT* se situe sur le chromosome 2A et jouerait un rôle crucial sur la teneur en protéines du grain (Nigro et al., 2014) confirmant ainsi l'impact de cette enzyme sur l'efficience d'utilisation de l'azote (Figure II.16.B).

II.2.c Efficience de Remobilisation de l'azote

L'efficience de remobilisation de l'azote est une composante majeure de l'EUtA notamment à la fin du cycle de culture du blé. En effet, pendant la phase reproductive des céréales, l'activité d'absorption racinaire diminue peu à peu pour laisser place au processus de remobilisation afin de subvenir aux besoins de l'épi en croissance (Figure II.18). Lorsque les organes végétaux entrent en sénescence (dégradation programmée des constituants cellulaires), une partie des composés azotés qu'ils contiennent est dégradée puis recyclée (Figure II.16.B). Chez le blé, le recyclage associé à la sénescence a lieu de feuille à feuille durant la phase de croissance végétative puis des parties végétatives vers les grains pendant la phase de remplissage. Elle est aussi efficace durant ces deux phases et peut atteindre 90% d'azote remobilisé dans le grain (Kong et al., 2016). Le niveau de réserves azotées accumulées avant floraison sera déterminant pour couvrir les besoins en azote des grains. Ainsi, tous les organes participent à la formation et au remplissage du grain grâce au processus de remobilisation associée à la sénescence monocarpique qui se manifeste en fin de cycle. Les feuilles et les gaines du blé représentent le plus important stock d'azote remobilisable (Barraclough et al., 2014). Les vieilles feuilles forment une source d'azote très intéressante puisqu'elles sont riches en protéines et notamment la Rubisco (Hörtensteiner and Feller, 2002). La sénescence de ces organes débute dès la fin de la floraison et permet à l'azote d'être remobilisé vers le grain (Figure II.18, Kong et al., 2016).

Au niveau moléculaire, l'initiation de la sénescence est marquée par l'induction des facteurs de transcription NAC (Zhao et al., 2015), NAM (ATAF 1.2 et CUC2 ; Kohl et al., 2015) et WRKY (Guo et al., 2012) (Figure II.18). Chez le blé, *TaNAC-S* (Zhao et al., 2015) et *TaNAM-B1* (ou Gpc-B1, Guttieri et al., 2013) sont les facteurs de transcription les plus étudiés puisqu'ils ont un impact important sur la qualité du grain. Plus généralement, les gènes induits lors de la sénescence sont nommés *Senescence-Associated Genes* (SAGs). La première étape est la



<u>Figure II.19</u> : Schéma des modifications physiologiques et protéomiques cellulaires associées à la sénescence foliaire. (+), augmentation pendant la sénescence (le nombre de + est proportionnel à l'effet) ; (-), diminution pendant la sénescence (le nombre de - est proportionnel à l'effet) ; CCV, chloroplast vesiculation containing bodies ; SAV, senescence associated vesicles ; RCB, RuBisCO containing bodies ; RBCL, large sous-unité de la RuBisCO ; ROS, reactive oxygen species ; SP, serine protease; VPE, vacuolar processing enzyme (d'après la thèse de Marine Poret, 2016).

dégradation des chloroplastes, qui contiennent jusqu'à 75% de l'azote de la cellule (Gregersen et al., 2008), grâce à l'activité des protéases, de processus d'oxydation liées à l'accumulation de ROS (Reactive Oxygen Species, Martínez et al., 2008) et des mécanismes d'autophagie (Sirko and Masclaux-Daubresse, 2021) (Figure II.19). La Rubisco (E.C. 4.1.1.39) est dégradée *via* des « Rubisco-containing-bodies » (RCB, Gregersen *et al.*, 2008) puis les produits issus de son hydrolyse sont stockés dans les vacuoles avec les protéines hydrolysées du lumen (Ishida and Yoshimoto, 2008) (Figure II.19). Les sérines protéases forment la famille la plus active durant le remplissage du grain de blé (Hollmann et al., 2014). Ensuite, les enzymes GS1 (Kichey et al., 2005), GDH (Bernard and Habash, 2009) et AS (Li et al., 2016) convertissent le glutamate et l'aspartate issus de la dégradation des protéines en glutamine et asparagine qui sont les principaux AAs utilisés pour le transport longue distance *via* le phloème (Figure II.16.B, Masclaux-Daubresse et al., 2010). Après déchargement au niveau des tissus puits, les AAs serviront à la synthèse de nouvelles protéines dans les organes en croissance.

L'initiation de la sénescence et des mécanismes de remobilisation associés dépendent principalement de la variabilité génotypique et de la disponibilité en nutriments, elles-mêmes dépendantes des facteurs environnementaux et endogènes (balance hormonale notamment) (Hebbar et al., 2014; Jibran et al., 2013; Lim et al., 2007). Par exemple, le maintien de l'absorption, notamment d'azote, inhibe la synthèse de certaines hormones qui retardent l'initiation de la sénescence (Figure II.18, Kichey et al., 2007). En effet, les cytokinines (CKs), les gibbérellines (GAs) et l'auxine (IAA) correspondent à des hormones régulant négativement la sénescence en la retardant (Guo and Gan, 2014; Jibran et al., 2013; Kant et al., 2015; Mueller-Roeber and Balazadeh, 2014) tandis que l'acide abscissique (ABA), l'acide salicylique (SA), l'éthylène (ET), le méthyl-jasmonate (MeJA), les brassinostéroïdes (BR) et les strigolactones (SL) correspondent à des hormones régulant positivement la sénescence en l'accélérant (Jibran et al., 2013; Khan et al., 2014; Kusaba et al., 2013; Lim et al., 2007) (Figure II.18). De plus, l'absorption d'azote maintient l'activité photosynthétique et ainsi les métabolismes azoté et carboné. Les plantes continuent alors de produire des glucides et des AAs qui profiteront directement au grain lors de la phase de remplissage. Ce phénomène communément nommé « stay-green » est directement profitable au rendement (Thomas and Howarth, 2000). Mais l'effet « stay-green » raccourcit la période de remobilisation qui peut donc perdre en efficacité. La quantité d'azote absorbé en post-floraison est ainsi corrélée

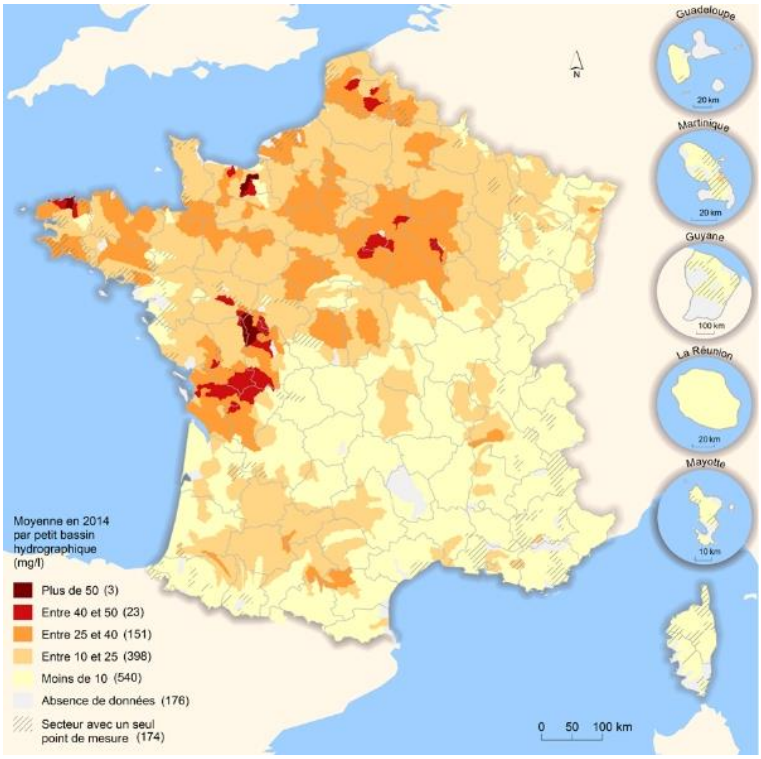
négativement à l'efficience de remobilisation. Pourtant, une meilleure remobilisation engendre des teneurs en protéines plus importantes dans le grain (Uauy et al., 2006; Ben Slimane et al., 2013). L'efficacité de la remobilisation est donc une composante essentielle pour l'augmentation de la teneur en protéines des grains et de leurs propriétés pour la transformation industrielle (Criado et al., 2009; Masclaux-Daubresse et al., 2008).

Une fertilisation azotée adéquate peut permettre d'améliorer simultanément l'accumulation de protéines dans le grain et le rendement (Zhang et al., 2012). Grâce à l'augmentation des apports azotés, l'efficience de remobilisation peut augmenter de 67% à 71% (Gaju et al., 2011). Pourtant, il a été clairement mis en évidence que d'importants apports azotés inhibent la remobilisation de l'azote mais permettent tout de même d'obtenir une teneur en protéines maximale (Barbottin et al., 2005). Par ailleurs d'autres facteurs environnementaux tels que la disponibilité en eau et la température ont un impact important sur l'efficience de la remobilisation de l'azote (Figure II.18, Kong et al., 2016). De manière générale, l'efficience de remobilisation de l'azote est pilotée par un équilibre et une régulation fine du statut nutritionnel et du déclenchement de la sénescence qui sont des déterminants majeurs du rendement et de la qualité du grain (Distelfeld et al., 2014).

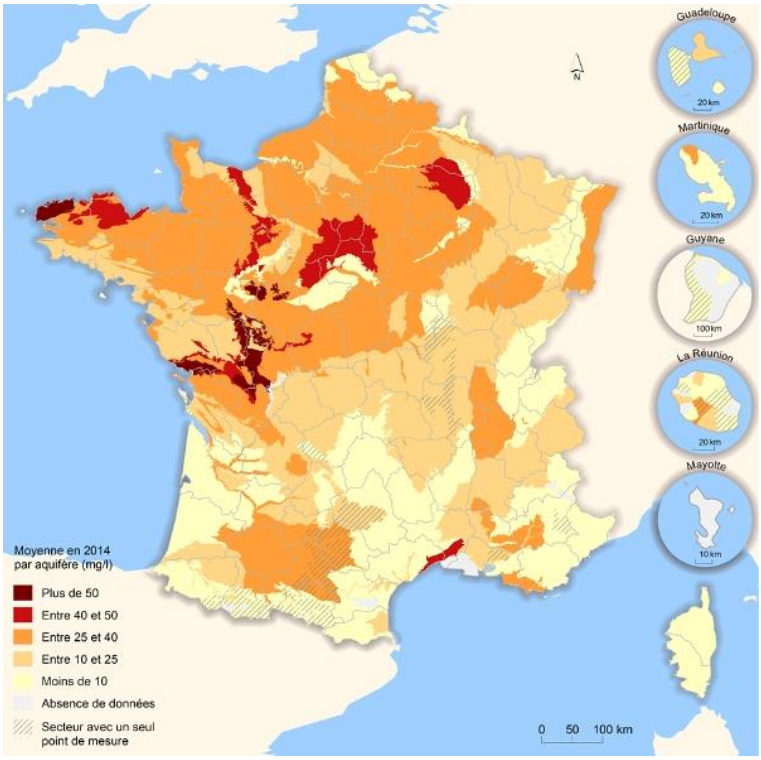
II.3 Azote et environnement

Quel que soit la forme d'engrais (ammonitrate, urée ou solution azotée), l'absorption, l'assimilation et/ou la remobilisation de l'azote sont limitées car les cultures céréalières sont capables d'utiliser seulement 30 à 40% de l'azote apporté (Kichey et al., 2007; Hawkesford and Riche, 2020). Lorsque les apports azotés sont supérieurs à la demande de la culture, des pertes peuvent avoir lieu de différentes manières. Dans le cas de pluies ou d'irrigation excessives, des phénomènes de lixiviation, de ruissellement et d'érosion sont observés et entrainent l'azote (sous forme de nitrate) hors du système sol-plante. Par ailleurs, les processus de nitrification et de dénitrification qui se manifestent naturellement dans les sols peuvent provoquer des pertes d'azote par voie gazeuse sous forme d'ammoniac, de monoxyde d'azote, de protoxyde d'azote et de diazote. Tous ces composés se retrouvent dans l'environnement et contribuent aux différentes problématiques actuelles telles que les développements d'algues vertes (nitrate), les particules fines (ammoniac) et le réchauffement climatique (gaz à effet de serre).

(A) Concentration en nitrates dans les cours d'eau en 2014



(B) Concentration en nitrates dans les eaux souterraines en 2014



<u>Figure II.20</u> : Concentration moyenne en nitrates (A) dans les cours d'eau et (B) les eaux souterraines en 2014 (Agence de l'eau, 2016).

II.3.a Le lessivage des nitrates

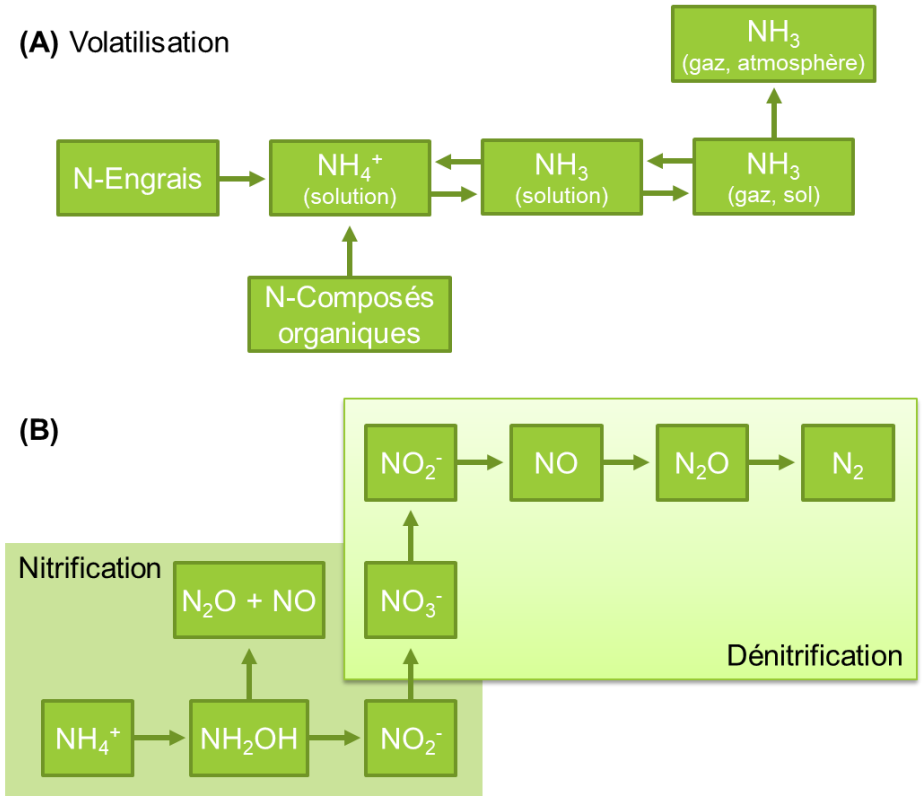
Issu des fertilisants azotés ou des processus de nitrification et dénitrification dans le sol, le nitrate est très facilement solubilisé. Présent dans la solution du sol, il devient très sensible au lessivage lors de pluies importantes. En suivant l'écoulement et l'infiltration de l'eau, il sort du système agronomique et se dirige vers des milieux aquatiques où il est à l'origine de phénomènes tels que l'eutrophisation des milieux. La quantité de nitrate lixiviée dépend de nombreux facteurs liés au climat et au système de culture en place. La quantité et l'intensité des précipitations, la température, l'évapotranspiration et les propriétés du sol (texture et structure) sont les principaux paramètres naturels influençant le lessivage du nitrate. En effet, les sols légers avec une forte proportion de sables sont beaucoup plus sensibles au phénomène que les sols argileux. Mais des pratiques culturales comme le labour, l'irrigation ou l'apport de grandes quantités d'engrais aggravent fortement la lixiviation du nitrate vers les eaux souterraines. A cela s'ajoute l'érosion, souvent dues à des terres sans couvert végétal durant l'hiver, qui provoque la perte de particules de sol contenant de grandes quantités d'azote adsorbé sous forme organique ou d'ammonium.

Alors que les concentrations en nitrate dans les eaux sont en général inférieures à 1 mg L^{-1}, certaines régions agricoles françaises dépassent le seuil de potabilité de 50 mg L^{-1} chaque année (norme retenue par l'Organisation Mondiale de la Santé, OMS) (Figure II.20). En effet, 66% du nitrate présent dans les eaux continentales proviennent de l'agriculture, 22% des collectivités locales et 12% de l'industrie. Par ailleurs, à de plus grandes profondeurs, la pollution en nitrate s'accentue puisque l'azote s'accumule dans les couches hydrogéologiques à la suite de pratiques remontant à plusieurs dizaines d'années (Figure II.20). Il est ainsi primordial de limiter la diffusion du nitrate dans les eaux continentales. La Directive Nitrate a été mise en place en 1991 au sein de l'Union Européenne pour tenter de freiner ces pollutions, mais ces dernières sont toujours d'actualité (Figure II.20).

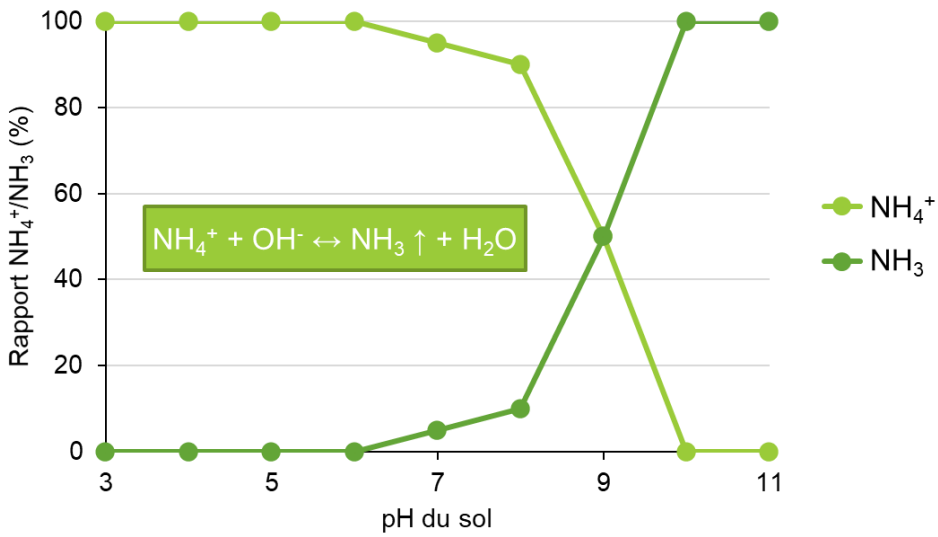
II.3.b La volatilisation d'ammoniac et d'oxydes d'azote

II.3.b.a Les émissions d'ammoniac

L'ammoniac (NH_3) est un polluant atmosphérique principalement lié au secteur agricole (94% des émissions). L'utilisation des engrais minéraux et organiques représente environ 25% des émissions (Citepa, 2018). D'un point de vue environnemental, les émissions d'ammoniac favorisent l'acidification des milieux en intensifiant la nitrification dans les sols,



<u>Figure II.21</u> : (A) Schéma de l'équilibre entre NH_4^+ et NH_3 induisant des phénomènes de volatilisation et (B) des processus de nitrification et dénitrification générant la volatilisation d'oxydes d'azote (N_2O et NO).



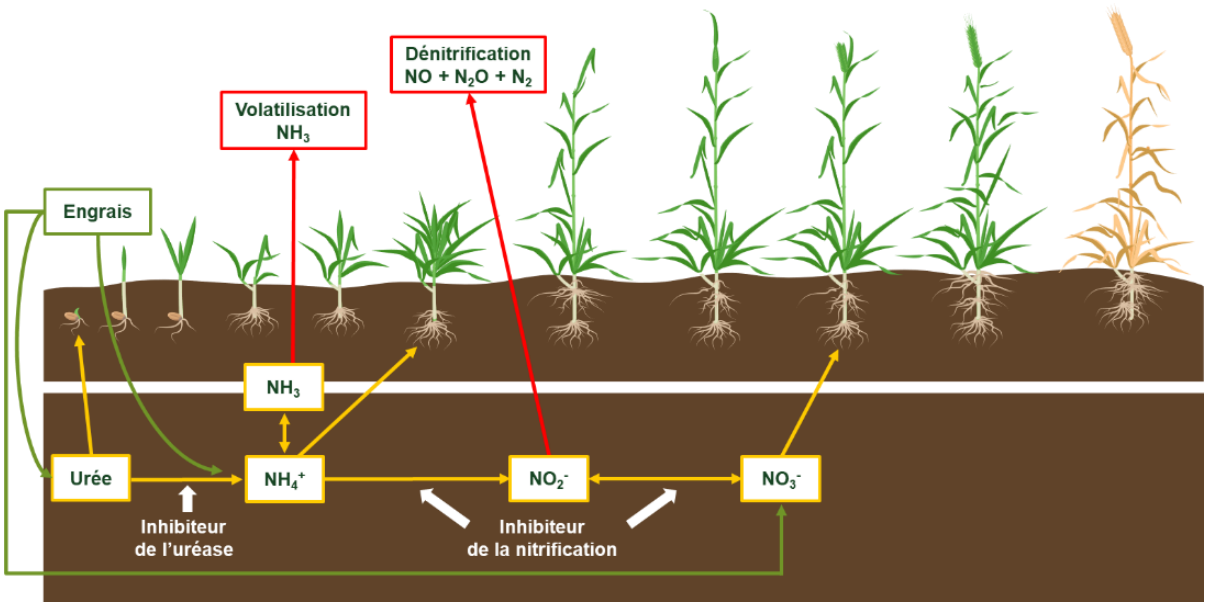
<u>Figure II.22</u> : Influence du pH sur l'équilibre du rapport NH_4^+/NH_3 dans le sol (Court et al., 1964).

l'eutrophisation et surtout la formation de particules secondaires dans l'atmosphère. En effet, les molécules d'ammoniac réagissent dans l'air avec des composés acides comme les oxydes d'azote ou de soufre et forment des particules secondaires très fines (Räbiger et al., 2020). Ces particules fines ont des effets sur la santé humaine, la santé des animaux et sur l'équilibre des écosystèmes (Emmerling et al., 2020).

La dégradation des fertilisants organiques et minéraux ainsi que celle des composés organiques produit de l'ammonium qui lui-même forme continuellement de l'ammoniac dans les sols. Les fertilisants contenant de l'urée et de l'ammonium sont donc les plus susceptibles de produire de l'ammoniac. D'un côté, l'urée est rapidement hydrolysée en NH_3 et CO_2 ; de l'autre, le NH_4^+ et le NO_2^- s'accumulent dans les sols. Comme l'ammonium se trouve en équilibre avec l'ammoniac dans le sol, des transferts d'ammoniac du sol vers l'atmosphère se mettent en place pour maintenir cet équilibre (Figure II.21.A). L'intensité de la volatilisation ammoniacale est déterminée par le vent, la température, l'humidité et le pH du sol (Hénault et al., 2019). La volatilisation est favorisée par les fortes températures et surtout dans les sols alcalins (Figure II.22, Dawar et al., 2021). En effet, l'augmentation du pH induit d'autant plus de dégagements d'ammoniac en déséquilibrant le rapport NH_4^+/NH_3 du sol (Figure II.22, Court et al., 1964). Ainsi, la concentration relative de l'ammoniac augmente de 5, 10 et 50% pour des pH neutre à basique (pH 7, 8 et 9 respectivement, Figure II.22). D'autres paramètres comme l'intensité de l'activité des uréases, la CEC (Capacité d'Echange Cationique) qui conduit à fixer plus ou moins les ions ammonium et les couverts végétaux ont une influence sur la volatilisation (Fiorini et al., 2020). Cette problématique des polluants atmosphériques préoccupe de plus en plus les pouvoirs publics. C'est pourquoi, le Plan national de Réduction des Emissions de Polluants Atmosphériques (PREPA) décrété le 10 mai 2017 prévoit une réduction de 13% des émissions de NH_3 d'ici à 2030.

II.3.b.b Les émissions d'oxydes d'azote

L'agriculture est responsable de 89% des émissions de protoxyde d'azote (N_2O, aussi appelé oxyde nitreux) principalement du fait des apports de fertilisants azotés d'origines minérale et organique (Citepa, 2018). Or, le N_2O est un puissant gaz à effet de serre (GES) : son pouvoir de réchauffement global est 265 fois plus important que le CO_2 (la référence, Stocker et al., 2013). Réglementé par le protocole de Kyoto, il s'agit du troisième plus important GES à contribuer au réchauffement de la planète après le CO_2 et le CH_4. Par ailleurs,



<u>Figure II.23</u> : Action des inhibiteurs de l'uréase et de la nitrification.

des émissions de NO sont souvent associées aux activités agricoles (Figure II.21.B). Dans l'atmosphère, il s'oxyde en peroxyde d'azote (NO_2). En retombant dans divers écosystèmes, ces deux composés azotés participent à l'acidification et à l'eutrophisation des milieux.

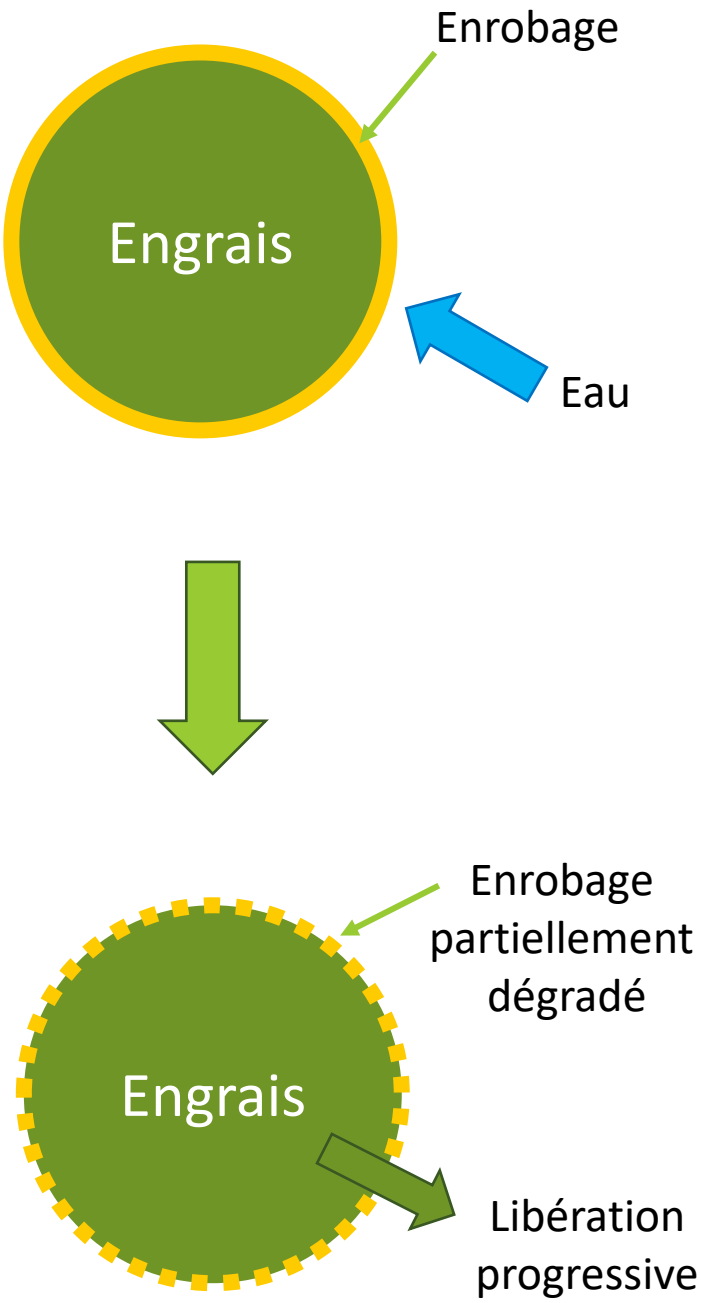
Les sols agricoles interviennent comme sources et puits de NO et de N_2O puisqu'ils sont impliqués dans de nombreux processus biotiques et abiotiques. La formation de ces composés est très dépendante de l'humidité du sol. Si les pores du sol sont remplis en dessous de 50% en eau, le processus de nitrification se met en place et produit du NO (Figure II.21.B). En revanche, entre 50 à 80% de remplissage, c'est l'activité dénitrifiante qui prend le dessus et produit du N_2O (Figure II.21.B). Enfin, à partir de 75%, le processus de dénitrification forme en priorité du diazote (N_2, Henault et al., 1998), gaz non polluant puisqu'il compose 78% de l'air ambiant (Figure II.21.B). La structure du sol et ses propriétés chimiques ont donc une forte influence sur les émissions de N_2O (Bessou et al., 2010). De plus, les pratiques culturales et notamment la fertilisation azotée ont d'importantes conséquences sur les émissions d'oxydes d'azote (Citepa, 2018). C'est pourquoi, dans le cadre du PREPA, la France a fixé comme objectif une diminution de 69% des oxydes d'azote d'ici à 2030. Tout comme pour la Directive Nitrates, le Plan PREPA prévoit différentes stratégies qui visent à réduire les risques pour l'environnement.

III. Stratégies pour limiter les risques environnementaux liés aux engrais azotés

III.1 La libération contrôlée des fertilisants azotés

III.1.a Les inhibiteurs de l'uréase et de la nitrification

Parmi les stratégies mises en place pour limiter les pertes d'azote dans l'air et les eaux de surface, les inhibiteurs de l'uréase et de la nitrification sont de plus en plus utilisés en France. Ils permettent de limiter la vitesse de transformation de l'azote dans le sol. Les inhibiteurs d'uréase ralentissent le passage de l'urée en ammonium alors que les inhibiteurs de la nitrification retardent l'oxydation de l'ammonium par les bactéries nitreuses aérobies (*Nitrosomonas*) et les bactéries nitrifiantes aérobies (*Nitrobacter*) (Figure II.23). Analogue de l'urée, le NBPT est l'inhibiteur de l'uréase le plus étudié et commercialisé (Krol et al., 2020). Dans la catégorie des urées additionnées de NBPT, Nexen (Koch Fertilizer Products SAS), Utec 46 (Eurochem Agro France) et Novius (In Vivo) sont les trois principaux produits. En France, l'imprégnation d'urée avec un inhibiteur d'uréase affiche une performance légèrement



<u>Figure II.24</u> : Principe d'enrobage de fertilisant à libération contrôlée (d'après Lawrencia et al, 2021).

meilleure que l'ammonitrate sur le rendement, tout en maintenant une teneur en protéines au même niveau selon l'institut technique Arvalis. Cette solution fonctionne aussi sur d'autres cultures telles que le colza (Heuermann et al., 2021). Par ailleurs, le NBPT peut aussi être ajouté à la solution azotée avec des technologies telles qu'Azokeep (Jouffray Drillaud) et AgroTain (Koch Fertilizer Products SAS). L'ajout de cet additif améliore les performances agronomiques de la solution azotée sans atteindre l'efficacité de l'ammonitrate selon l'institut technique Arvalis. Pour autant, de nombreuses études ont montré le rôle positif des inhibiteurs en mélange avec la solution azotée sur les émissions de NH_3 et le rendement des cultures, notamment sur le blé (Liu et al., 2019; Nikolajsen et al., 2020). D'autres inhibiteurs sont utilisés dans différentes régions du monde, notamment le N-(n-propyl)-thiophosphoric triamide (NPPT), le dicyandiamide (DCD), le DMPP et le 3,4-Dimethylpyrazole succinic acid (DMPSA) (Abalos et al., 2014; Guardia et al., 2018; Krol et al., 2020). Néanmoins, les inhibiteurs de l'uréase et de la nitrification ont été récemment remis en cause par l'ANSES en raison de leurs risques pour l'Homme et l'environnement (ANSES, 2019). Il existe d'autres solutions chimiques telles que l'ammonium thiosulfate (ATS), le calcium thiosulfate (CaTS), le potassium thiosulfate (KTS) ou des copolymères mais ces composés restent des inhibiteurs chimiques et peuvent donc impacter la vie du sol et le développement des plantes (Cai et al., 2018; Castellano-Hinojosa et al., 2020; Krogmeier et al., 1989; Zanin et al., 2016). C'est pourquoi, il est important de trouver des alternatives efficaces et sans danger pour la santé humaine et les écosystèmes.

III.1.b L'enrobage des engrais azotés pour libérer progressivement l'azote

L'enrobage des fertilisants par des polymères neutres permet de libérer progressivement le fertilisant pour répondre aux besoins de la plante tout au long de son cycle (Figure II.24). Cette synchronisation limite les pertes dans l'environnement. Des matériaux inorganiques et organiques ainsi que des polymères synthétiques et naturels sont utilisés pour préparer ces engrais innovants (Lawrencia et al., 2021). Ces enrobages sont principalement utilisés pour les fertilisants solides sous forme de granulés. Par exemple, la croissance, la physiologie, le rendement, la teneur en huile et l'EUA du tournesol sont améliorés grâce l'application d'un engrais enrobé (Perveen et al., 2021). Par ailleurs, en comparant avec un fertilisant classique (urée seule), une urée enrobée par des lignosulfonates permet d'augmenter de 35% le rendement du riz en conditions contrôlées (Gil-Ortiz et al., 2020a).

<u>Table II.2</u> : Catégories de matières constitutives (CMC) pour les fertilisants selon la réglementation définie par l'UE

CMC	Matières
1	Substances et mélanges à base de matières vierges
2	Végétaux, parties de végétaux ou extraits de végétaux
3	Compost
4	Digestat issu de cultures végétales
5	Digestat autre qu'issu de cultures végétales
6	Sous-produits de l'industrie alimentaire
7	Micro-organismes
8	Polymères nutritifs
9	Polymères autres que des polymères nutritifs
10	Produits dérivés au sens du règlement (CE) N°1069/2009
11	Sous-produits au sens de la directive 2008/98/CE

Néanmoins, cet enrobage était enrichi avec des acides humiques qui peuvent être considérés comme des biostimulants. En effet, les technologies d'enrobage sont souvent associées à des molécules biostimulantes telles que les extraits d'algues et les substances humiques. Ces associations sont d'ailleurs efficaces pour le blé puisqu'elles permettent une réduction de 20% d'azote pour les mêmes performances agronomiques (Gil-Ortiz et al., 2020b). Des organismes vivants comme les champignons *Trichoderma* ont aussi un intérêt à être combinés avec des polymères biologiques (Rouphael et al., 2020). En revanche, l'ajout d'enrobages des molécules azotées de la solution azotée est beaucoup plus rare du fait de sa complexité. Une étude montre tout de même l'effet d'un biochar préconditionné avec de la solution azotée sur la productivité du maïs : l'ajout du biochar a permis d'augmenter la biomasse du maïs, l'absorption d'azote et ainsi la teneur en azote dans les tissus en fonction des types de sol (Dil et al., 2014). Toutes ces dernières innovations à base de molécules biostimulantes montrent l'intérêt de ces solutions pour accroitre l'EUA et la productivité des grandes cultures.

III.2 Les biostimulants

III.2.a Définitions et propriétés

L'une des définitions scientifiques très utilisée décrit les biostimulants « *comme des substances et/ou des micro-organismes dont la fonction, lorsqu'appliqués aux plantes ou à la rhizosphère, est la stimulation des processus naturels qui favorisent/améliorent l'absorption ou l'utilisation des nutriments, la tolérance aux stress abiotiques et/ou la qualité de la culture, indépendamment de la présence de nutriments* » (du Jardin, 2015). Au niveau règlementaire, le nouveau règlement UE 2019/1009 du parlement Européen et du Conseil du 25 juin 2019, publié au Journal Officiel de l'Union Européenne, entrera en application le 16 juillet 2022. Il établit les nouvelles règles relatives à la mise sur le marché des fertilisants UE et intègre les biostimulants dans les Matières Fertilisantes et Supports de Culture (MFSC) dans la catégorie PFC 6. Cette catégorie distingue les biostimulants microbiens (PFC 6 A) et les non-microbiens (PFC 6 B). La définition officielle d'un biostimulant des végétaux est la suivante : « *fertilisant UE ayant pour fonction de stimuler les processus de nutrition des végétaux indépendamment des éléments nutritifs qu'il contient, dans le seul but d'améliorer une ou plusieurs des caractéristiques des végétaux ou de leur rhizosphère suivantes : l'efficacité d'utilisation des éléments nutritifs ; la tolérance au stress abiotique ; les caractéristiques qualitatives ; ou la disponibilité des éléments nutritifs confinés dans le sol ou la rhizosphère.* »

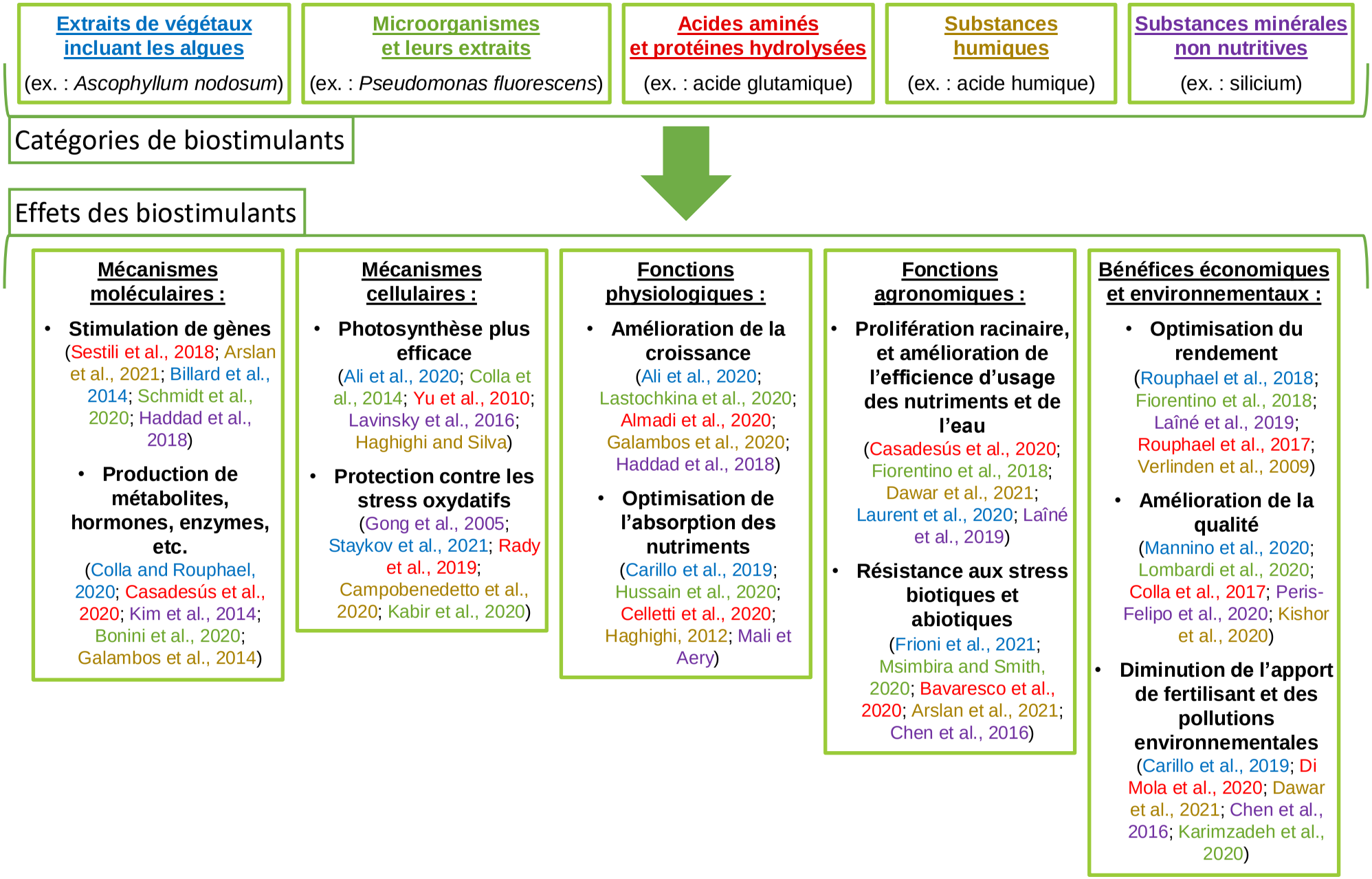


Figure II.25 : Principales catégories de biostimulants et leurs effets sur les mécanismes moléculaires et cellulaires des plantes, sur leurs fonctions physiologiques et agronomiques ainsi que les bénéfices économiques et environnementaux qu'ils apportent.

Un fertilisant UE est : « *une substance, un mélange, un microorganisme ou tout autre matières appliqués ou destinés à être appliqués sur des végétaux ou leur rhizosphère ou sur des champignons ou leur microsphère, ou destinés à constituer la rhizosphère ou la microsphère, seuls ou mélangés avec une autre matière, dans le but d'apporter aux végétaux ou aux champignons des éléments nutritifs ou d'améliorer leur efficacité nutritionnelle ; sur lequel est apposé le marquage CE lors de sa mise à disposition sur le marché.* » Chaque fertilisant UE est exclusivement composé de catégories de matières constitutives (CMC, Table II.2). Les propriétés d'un biostimulant sont donc la conséquence de sa formulation complexe, et non pas la conséquence de la seule présence d'un élément nutritif, d'un régulateur de croissance ou d'un agent protecteur connu (Yakhin et al., 2017; Boulogne, 2020).

Ces formulations sont donc classées selon leurs propriétés en plusieurs catégories. L'un des effets souvent constaté est l'amélioration de l'absorption des éléments par la plante (Figure II.25). En effet, ce type de biostimulant permet d'augmenter l'absorption de macroéléments tels que l'azote (Teixeira et al., 2018), le phosphore (Karimzadeh et al., 2020) et le potassium (Dziugieł and Wadas, 2020) mais aussi de microéléments tels que le fer (Rahimi et al., 2020) et le zinc (Wang et al., 2020). Cet effet est souvent dû à l'amélioration de la biodisponibilité de ces éléments au profit de la plante, notamment pour le potassium et le phosphore (Elhaissoufi et al., 2020; Roslan et al., 2020). La tolérance aux stress abiotiques (sécheresse, inondation, froid, sel, etc.), grâce à une meilleure résilience des cultures, est aussi une propriété reconnue aux biostimulants (Figure II.25). Le silicium et les extraits d'algues sont particulièrement efficaces pour lutter contre ces stress (Carmody et al., 2020; Frioni et al., 2021; Parveen et al., 2019). Par ailleurs, certaines formulations permettent d'améliorer la qualité des produits récoltés tels que les fruits (Francesca et al., 2020; Rodrigues et al., 2020) (Figure II.25). Enfin, les biostimulants peuvent avoir des effets positifs sur les propriétés du sol notamment en agissant sur l'activité microbienne (Hellequin et al., 2020, 2018).

III.2.b Principales catégories

Même si les biostimulants se définissent par leur mode d'action plus que par la nature de leurs constituants, un consensus s'impose autour de cinq grandes catégories (Figure II.25) : (i) les extraits de végétaux (incluant les algues), (ii) les microorganismes et leurs extraits, (iii) les AAs et protéines hydrolysées, (iv) les substances humiques (acides humiques, acides

fulviques, lignosulfonates) et (v) les substances minérales non nutritives (du Jardin, 2015; Yakhin et al., 2017; Boulogne, 2020).

III.2.b.a Les extraits de végétaux

Les extraits végétaux peuvent provenir d'espèces très variées de plantes supérieures (telles que *Urtica dioica* L. ou *Symphytum officinale*), d'algues (principalement *Ascophyllum nodosum*) et de microalgues (*Chlorella vulgaris* et *Spirulina maxima* par exemple). Ces préparations sont souvent obtenues par extractions aqueuses, par solvants, par micro-ondes, par hautes pressions, par hydrolyses ou par fermentations (Yakhin et al., 2017). L'espèce et le procédé d'extraction influencent fortement la composition du biostimulant. Ces extraits contiennent de nombreuses molécules telles que des composés phénoliques, des lipides, des protéines, des composés aromatiques ou des acides inorganiques ayant diverses activités biologiques (Boulogne et al., 2012; Jardin et al., 2020). Ils contiennent aussi le plus souvent des macro- (N, P, K, S, Ca et Mg notamment) et/ou microéléments (Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Mo, et Co notamment) (Yakhin et al., 2017). Ces formulations complexes ont donc de nombreux effets sur le développement des plantes : amélioration de la croissance (Ali et al., 2020), de l'absorption des nutriments (Carillo et al., 2019), du rendement (Rouphael et al., 2018), de la qualité des produits de récolte (Mannino et al., 2020) et de la résistance au stress (Frioni et al., 2021) (Figure II.25). Ces impacts sont dus à l'action de ces biostimulants aux niveaux cellulaire et moléculaire (photosynthèse, synthèse de métabolites, d'hormones, et/ou d'enzymes) (Ali et al., 2020; Colla and Rouphael, 2020; Boulogne, 2020) (Figure II.25).

III.2.b.b Les microorganismes et leurs extraits

Les champignons et les bactéries sont naturellement présents autour des plantes : dans les sols, la rhizosphère, la phyllosphère et l'atmosphère (Boulogne, 2020). Ces microorganismes interagissent avec les plantes de différentes manières telles que le mutualisme, le commensalisme et le parasitisme (Lemanceau et al., 2017). Parmi ces interactions, certaines d'entre elles sont bénéfiques au développement des organismes végétaux. De nombreux microorganismes sont donc utilisés en tant que biostimulant puisque leurs propriétés sont extrêmement diverses (Calvo et al., 2014; du Jardin, 2015; Fiorentino et al., 2018; Hellequin et al., 2020; Yakhin et al., 2017). L'espèce de champignon *Trichoderma* (Fiorentino et al., 2018) et les bactéries des espèces *Bacillus* (Nguyen et al., 2019), *Lactobacillus* (Lamont et al., 2017), *Azospirillum* (Filipini et al., 2020), *Azotobacter* (Wang et al., 2020), *Pseudomonas* (Angelina et al., 2020) et *Rhizobium* (Rafique et al., 2021) sont les

principales souches utilisées en agriculture. Par ailleurs, des préparations à base de microorganismes non-vivants et de leurs métabolites, obtenues par hydrolyses (acides, basiques ou enzymatiques), fermentation et ou lyophilisation, sont aussi utilisées pour leurs fonctions biostimulantes (Laurent et al., 2020; Mannino et al., 2020; Yakhin et al., 2017). Elles contiennent notamment des AAs, des oligopeptides, des bétaïnes, de la mélatonine et des phytohormones qui agissent à plusieurs niveaux (moléculaire, cellulaire et physiologique) (Yakhin et al., 2017). Les microorganismes et leurs métabolites ont des effets sur la croissance (Lastochkina et al., 2020), l'absorption des nutriments (Hussain et al., 2020b), le rendement (Fiorentino et al., 2018), la qualité des produits récoltés (Lombardi et al., 2020) et la tolérance aux stress (Msimbira and Smith, 2020) (Figure II.25).

III.2.b.c Les acides aminés et protéines hydrolysées

Cette catégorie inclue les AAs tels que la proline et l'acide glutamique (du Jardin, 2015) ainsi que les hydrolysats de protéines provenant de diverses matières ayant subies une hydrolyse chimique ou enzymatique telles que les co-produits agricoles et alimentaires (Colla et al., 2014; Paul et al., 2019). L'application d'AAs et/ou de peptides a un effet biostimulant sur de nombreux paramètres physiologiques. Par exemple, ces composés améliorent la croissance (Almadi et al., 2020), l'absorption d'éléments nutritifs (Celletti et al., 2020), la floraison (Polo and Mata, 2017), et la tolérance au stress hydrique (Bavaresco et al., 2020) ou thermique (Casadesús et al., 2020) (Figure II.25). Leur action se situe tant au niveau cellulaire en agissant sur l'activité photosynthétique (Colla et al., 2014) que moléculaire en agissant sur l'expression de gènes (Sestili et al., 2018) ou le métabolisme des hormones (Casadesús et al., 2020) (Figure II.25).

III.2.b.d Les substances humiques

Il s'agit de composés issus de la décomposition et de la transformation de la matière organique (compost, déchets organiques, gisements naturels, etc.) par des microorganismes (du Jardin, 2015; Yakhin et al., 2017; Boulogne, 2020). Du fait de leurs différentes origines, les substances humiques sont très complexes et sont généralement composés de plusieurs substances organiques de haut et bas poids moléculaires. Elles peuvent donc contenir des acides humiques et fulviques ainsi que d'autres composés tels que des humines, des hormones, des minéraux et des microorganismes (Yakhin et al., 2017). Du fait de cette diversité, leur mode d'action et leur impact sur les végétaux sont multiples. Appliquées par voie foliaire ou racinaire, les substances humiques ont des effets bénéfiques notamment sur

la croissance (Galambos et al., 2020), l'absorption des éléments nutritifs (Haghighi, 2012) et la résistance aux stress (Arslan et al., 2021) de multiples végétaux (Figure II.25).

III.2.b.e Les substances minérales non nutritives

Les molécules inorganiques non nutritives sont considérées comme des biostimulants si elles ont un effet bénéfique sur les végétaux sans être un élément minéral essentiel à leur croissance (Boulogne, 2020). Il s'agit principalement de l'aluminium, du cobalt, du sélénium, du sodium et du silicium ou de combinaisons polyatomiques telles que les silicates (du Jardin, 2015). La principale substance minérale non nutritive étudiée est la silice. Cet élément est capable d'améliorer la croissance des plantes et la qualité des produits de récolte dans de nombreuses situations (Haddad et al., 2018; Hoseinian et al., 2020; Kowalska et al., 2020; Peris-Felipo et al., 2020). L'un des principaux intérêts du silicium est son utilisation pour la lutte contre les stress. Qu'ils s'agissent de stress nutritionnel (Chen et al., 2016), hydrique (Hameed et al., 2021; Parveen et al., 2019) ou lié aux métaux lourds (Adrees et al., 2015), le silicium a un effet bénéfique (Figure II.25).

III.2.c Intérêt des biostimulants pour optimiser l'EUA

De nombreuses études montrent la capacité des biostimulants à optimiser l'acquisition de l'azote et l'efficience d'utilisation de l'azote (Cardarelli et al., 2020; Dellagi et al., 2020; Di Mola et al., 2020; Laurent et al., 2020). La glutamine fait partie des biostimulants améliorant l'absorption d'azote et la biomasse du maïs (Hassan et al., 2020). Diverses souches de *Trichoderma* augmentent aussi l'efficience d'absorption de l'azote (Fiorentino et al., 2018). L'efficience d'assimilation de l'azote par les plantes peut aussi être améliorée grâce aux biostimulants (Yu et al., 2010). En effet, ces préparations sont capables de stimuler l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote et donc d'améliorer l'assimilation de cet élément (Sestili et al., 2018). De plus, l'application d'AAs en enrobage de semences ou en foliaire stimule le métabolisme azoté et la productivité du soja (Teixeira et al., 2018). Par ailleurs, l'application de silicium permet de retarder la sénescence du colza et ainsi de maintenir la plante active plus longtemps (Haddad et al., 2018). Les biostimulants peuvent aussi avoir un impact sur la distribution de l'azote ; des extraits d'algue et de champignon ont ainsi montré un effet bénéfique sur la remobilisation de l'azote chez le blé dur (Laurent et al., 2020). La principale raison du développement des biostimulants dans les systèmes agricoles est leur faculté à améliorer l'EUA (Rouphael and Colla, 2018). Ces solutions

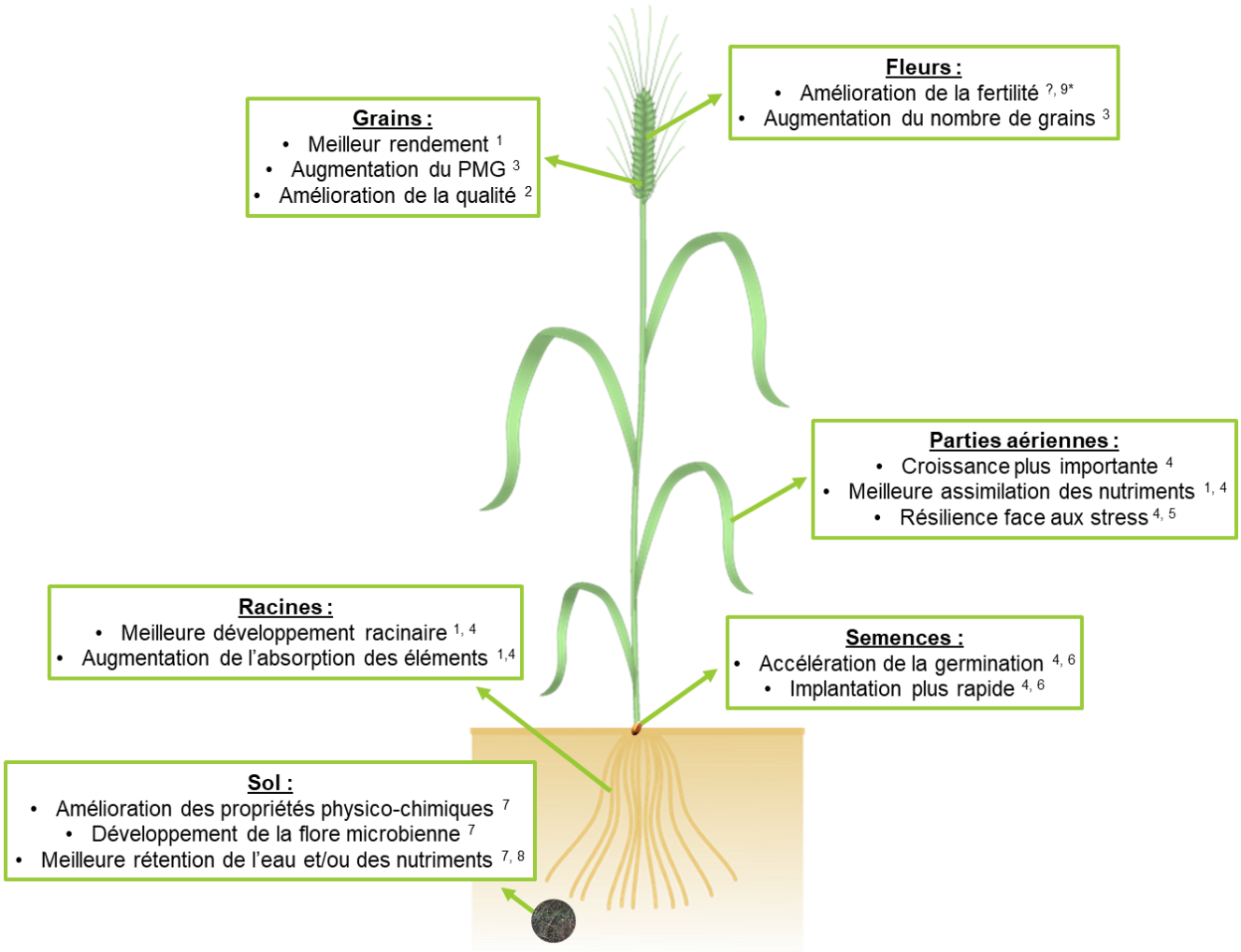


Figure II.26 : Principaux effets des biostimulants sur la culture de blé. [1] Nguyen et al., 2019; [2] Popko et al., 2018; [3] Yadav et al., 2020; [4] Ali et al., 2020; [5] Arslan et al, 2020; [6] Maswada et al., 2020; [7] Hellequin et al., 2018; [8] Bist et al., 2020; [9] Polo et Mata (* sur tomate)

peuvent ainsi venir en compléments des fertilisants classiques dans le but de réduire les quantités d'engrais apportés (Calvo et al., 2014), notamment sur le blé tendre.

III.2.d Les biostimulants pour augmenter la productivité et la qualité du blé

L'application de biostimulants sur le blé peut avoir de nombreux bénéfices, le plus attendu étant l'amélioration de la productivité (Figure II.26). Sur ce critère, différentes formulations à base d'extraits d'algues, de champignons, de bactéries ou d'hydrolysats de protéines permettent d'augmenter le rendement en grains du blé (Kumar Sootahar et al., 2020; Nguyen et al., 2019; Pichereaux et al., 2019; Popko et al., 2018; Yadav et al., 2020). Ce gain est souvent obtenu grâce à une meilleure résistance à des stress biotiques ou abiotiques tels que les maladies (Gunupuru et al., 2019), la sécheresse (Ali et al., 2020; Arslan et al., 2021; Karimzadeh et al., 2020) ou encore le stress salin (Ji et al., 2020) (Figure II.26). Une meilleure absorption des éléments est aussi fréquemment mise en avant dans les études sur le blé avec principalement le phosphore (Elhaissoufi et al., 2020; Karimzadeh et al., 2020) et l'azote (Laurent et al., 2020; Nguyen et al., 2019) (Figure II.26). Concernant l'azote, trois transporteurs d'ammonium du blé sont notamment régulés par la présence de mycorhizes arbusculaires (Duan et al., 2015). Par ailleurs, l'application d'extraits d'algues ou de champignons augmente l'absorption d'azote, accélère la sénescence et améliore la remobilisation de l'azote chez le blé dur (Laurent et al., 2020). Les biostimulants impactent aussi la qualité du grain : les protéines métaboliques et de réserves peuvent être affectées (Pichereaux et al., 2019) tout comme le ionome, notamment la teneur du grain en azote, phosphore, fer, cuivre et zinc (Popko et al., 2018; Yadav et al., 2020) (Figure II.26).

III.3 Des outils de diagnostic pour l'optimisation de la nutrition des plantes et de la qualité des produits de récolte

L'agriculture se modernise et utilise de plus en plus d'innovations technologiques lui permettant notamment d'avoir des informations sur le statut nutritionnel des cultures. L'utilisation d'outils tels que les satellites (Farmstar® et Sentinel par exemple) et les capteurs embarqués (N-Sensor® par exemple) se généralise aujourd'hui. D'autres techniques applicables au laboratoire et en conditions de plein champ sont aussi utilisées ou en cours de développement. Plusieurs méthodes sont principalement basées sur les propriétés optiques des plantes (fluorescence, transmittance et réflectance) mesurées à l'échelle d'une feuille ou d'un couvert. D'autres méthodes innovantes telles que la technologie XRF portable

Multiplex®
(Force-A)

SPAD
(Konica Minolta Sensing)

LabSpec®
(ASD Inc.)

S1 Titan
(Bruker)

<u>Figure II.27</u> : Outils de diagnostic utilisés durant les travaux de recherche. Fluorimètre (Multiplex®) pour mesure des indices de chorophylles, de flavanols, d'anthocyanes et statut azoté ; pince SPAD pour mesure de l'indice de chlorophylles ; système NIRS portable (LabSpec®) pour mesure des spectres de réflectance en proche infra-rouge permettant notamment de déterminer la teneur en azote ; pistolet XRF (Fluorimètre à rayon X, S1 Titan) pour détermination des teneurs en éléments (S, P, K, Ca, Fe, Zn, etc.).

(fluorescence à rayons X) connaissent un essor particulier pour déterminer le statut nutritionnel et évaluer les modifications du ionome des végétaux.

III.3.a Des outils pour optimiser l'EUA

Plusieurs technologies basées sur la fluorescence ont été développées pour les sciences du végétal. Parmi celles-ci, le Mutliplex® (Force-A, Orsay, France) est l'une des plus utilisées au sein de l'UMR EVA (Figure II.27). Il s'agit d'un fluorimètre portable capable de mesurer 9 signaux de fluorescence. Il est équipé de 4 canaux d'excitation (UV, bleu, vert et rouge) et de 3 canaux de détection (émission). Ces signaux de détection permettent de calculer différents indicateurs pertinents en physiologie végétale tels que le niveau en chlorophylles, en flavonols et en anthocyanes ainsi qu'un indice de nutrition azotée. Ces données sont utiles pour étudier les stress abiotiques et le statut nutritionnel des plantes en dynamique puisque la mesure est non-destructive. Cet outil permet la mesure de l'ensemble du couvert végétal et n'est pas sensible aux fluctuations des conditions lumineuses. Il peut donc être facilement utilisé en laboratoire, en serre et au champ. Le Multiplex® est employé sur de nombreuses cultures pour optimiser la nutrition azotée et notamment sur le blé (Song et al., 2017; Zecha et al., 2018). Cette technologie a aussi été déclinée sous la forme d'une pince (Dualex®) qui permet de mesurer rapidement les paramètres physiologiques des feuilles sur une zone de 5 mm. Cette pince est souvent utilisée sur la dernière feuille étalée du blé puisque celle-ci est représentative du statut azoté de la plante (Cartelat et al., 2005; Tremblay et al., 2009; Upreti et al., 2019).

Basée sur une mesure de transmittance, la pince SPAD-502® (Konica Minolta Inc., Japon) est un autre analyseur de la teneur en chlorophylles des feuilles (Figure II.27). Cet outil non-destructif envoie un faisceau de lumière sur la feuille (2 x 3 mm) pour mesurer une différence de densité optique à deux longueurs d'onde : dans le rouge (650 nm) et dans l'infrarouge (940 nm). Le rapport entre les intensités des radiations rouges (spécifiques des chlorophylles) et infrarouges (faiblement absorbées par les chlorophylles) permet d'estimer les teneurs en chlorophylles (exprimées en unité arbitraire ou unité SPAD). Plus la valeur indiquée est élevée, plus la teneur en chlorophylles est élevée. La pince SPAD est très largement utilisée sur le blé puisqu'il s'agit d'un outil développé à grande échelle par le groupe Yara (N-Tester®). Par ailleurs, de nombreux travaux scientifiques ont recourt à cette

technologie pour étudier la nutrition azotée du blé (Cartelat et al., 2005; Casa et al., 2015; Ravier et al., 2017).

III.3.b Intérêt de la fluorescence à rayons X pour la détermination du statut nutritionnel et des modifications du ionome

La fluorescence par rayon X permet d'effectuer rapidement (64 à 90 secondes) et avec précision une analyse élémentaire allant du magnésium jusqu'à l'uranium sur une zone de quelques millimètres et sur des matrices très diverses (matériel végétal frais ou sec, sol, échantillon solide, en gel, poudre ou liquide). L'appareil émet des rayons X qui excitent les électrons des atomes présents dans l'échantillon analysé. Cette excitation se traduit par une éjection d'électron au sein de la couche électronique de l'atome. Cet état est instable et l'atome va revenir à son état fondamental en libérant de l'énergie sous forme de fluorescence X grâce aux électrons venus des couches supérieures qui remplacent les électrons éjectés. Chaque atome ayant une couche électronique distincte, l'énergie émise par fluorescence est caractéristique et proportionnelle à la présence de chaque atome. Le modèle S1 Titan (Bruker, Figure II.27) est équipé d'un détecteur haute performance Silicon Drift Detector à fenêtre en graphène. Il a l'avantage d'être portable, ce qui permet d'effectuer des mesures non-destructrives sur le terrain. À la suite d'un travail de calibration, cette technologie permet de prédire la teneur en éléments des différents organes des végétaux. Plusieurs études ont montré l'intérêt de cette technique pour les sciences du végétal, notamment sur les feuilles de vigne (Bravo et al., 2017), de blé, de maïs, de coton, de tournesol, de pois chiche et de lentille (Gunes et al., 2009; McLaren et al., 2012). Dans les graines du colza (Poisson et al., 2019), les fruits tels que les pommes, le Ca et le K ont pu être mesurés grâce à la fluorescence par rayon X (Kalcsits, 2016). Pour la farine de blé, les teneurs en S (Griffiths et al., 1990), Cu, Mn, Fe, Zn et Se (Machado et al., 2018; Paltridge et al., 2012) peuvent être déterminées par XRF. De récentes études montrent aussi le potentiel de cette technologie pour localiser les éléments dans un organe comme le grain de blé (Ajiboye et al., 2015; Brier et al., 2015; Ramos et al., 2016) ou de riz (Marques et al., 2021).

III.3.c La spectrométrie proche infrarouge : un outil polyvalent

La spectrométrie proche infrarouge (NIRS) permet des mesures de spectre de réflectance qui offrent de nombreuses applications qualitatives et quantitatives grâce à une analyse rapide et non-destructive d'échantillons très divers. Par exemple, le LabSpec® (ASD

Inc., Figure II.27) détermine le spectre de réflectance d'un échantillon entre 350 et 2500 nm. Cette technologie peut être employée au laboratoire sur des échantillons comme la farine et le grain mais aussi au champ sur des feuilles (une pince peut s'adapter à l'appareil). Après un travail de calibration, la NIRS peut fournir des prédictions précises de certains paramètres physiologiques et biochimiques. Sur le blé dur, la technologie NIRS peut être très utile pour déterminer la teneur en azote des feuilles (Ecarnot et al., 2013; Vilmus et al., 2014). Chez le blé tendre, le NIRS est couramment utilisé pour déterminer la teneur en protéines du grain (Ye et al., 2018) et de nombreux paramètres de qualité de la farine tels que le volume de la pâte (Crosbie et al., 2007), les gliadines (García-Molina et al., 2016), le gluten (Chen et al., 2017) et les qualités boulangères (Gabriel et al., 2017). Malgré ses nombreuses applications, la technologie NIRS est encore peu utilisée pour prédire des traits liés au rendement ou à la qualité du grain de blé tendre à partir de mesure de réflectance réalisées sur la plante au cours de son cycle de développement. La mise au point de ce type de prédiction à partir d'une analyse des spectres de réflectance réalisée sur la feuille drapeau du blé tendre pourrait ouvrir de nombreuses perspectives pour un meilleur pilotage des pratiques de fertilisation et d'applications de biostimulants visant à améliorer l'EUA et/ou les composantes du rendement et de la qualité grainière chez cette céréale.

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Comme précisé dans cette synthèse bibliographique, il est aujourd'hui nécessaire de réduire les pertes d'azote par une approche globale des systèmes, notamment pour le blé tendre qui présente une faible EUA (Hawkesford and Riche, 2020) malgré une efficience de remobilisation qui peut atteindre 90% (Kong et al., 2016). Cela signifie que les pertes d'azote proviennent essentiellement d'une faible efficience d'absorption de celui-ci au cours du cycle, notamment pendant la phase reproductive (Kichey et al., 2007; Taulemesse et al., 2016). Ces pertes d'azote affectent le rendement de la culture et contribue à (i) la pollution des nappes phréatiques *via* la lixiviation du nitrate et (ii) la pollution de l'air *via* la production de GES. L'ensemble du monde agricole doit donc poursuivre les efforts pour que chaque unité d'azote appliquée soit absorbée, assimilée et remobilisée pour le grain. Accroitre l'EUA pour minimiser les risques environnementaux et maximiser les performances agronomiques est encore possible. Alors que 50 à 70% des engrais azotés ne sont pas utilisés dans l'année de l'application (Hawkesford and Riche, 2020), la marge de progression pour augmenter

l'efficacité des fertilisants est considérable. L'agriculture de précision et les outils d'aide à la décision sont des dispositifs permettant d'appliquer la bonne dose au bon endroit. Mais, un dernier paramètre semble aussi indispensable : épandre un fertilisant que la plante absorbe et assimile efficacement et rapidement pour que l'azote ne s'accumule pas dans le sol. Les additifs aux engrais azotés agissant sur le métabolisme azoté des plantes présentent ce potentiel d'innovation dont le monde agricole a dorénavant besoin. Plusieurs études montrent le potentiel d'amélioration de l'EUA chez le blé grâce aux biostimulants (Laurent et al., 2020; Nguyen et al., 2019). Dans un contexte de réduction des GES, l'apport d'un fertilisant innovant (engrais mélangé avec le biostimulant) pourrait donc être un levier intéressant pour améliorer l'EUA du blé tendre tout en limitant l'impact sur l'environnement (moins de pertes d'azote et aucun passage de tracteur supplémentaire générant des GES).

Par ailleurs, une meilleure absorption d'azote grâce au biostimulant pourrait prolonger la durée de vie des feuilles en maintenant les capacités de photosynthèse et en améliorant le niveau d'accumulation des composés azotés dans les organes végétatifs qui pourraient conduire à une meilleure efficience de remobilisation de l'azote vers le grain en fin de cycle. De plus, une telle stratégie pourrait également permettre le maintien voire l'augmentation des rendements en réponse à de faibles apports d'intrants azotés et ainsi améliorer le bilan agro-environnemental de la culture du blé (de Oliveira Silva et al., 2020). Le maintien de l'absorption et de l'assimilation de l'azote pendant la phase reproductive apparaît donc comme un processus essentiel dans l'élaboration du rendement et de la teneur en protéines du blé. En effet, une sénescence trop avancée induite par des facteurs exogènes (comme une carence en azote ou un stress hydrique) provoque l'arrêt précoce du fonctionnement des organes végétatifs limitant ainsi la fourniture de nutriments aux organes en croissance (organes puits), c'est-à-dire principalement la feuille drapeau et l'épi à partir de la floraison du blé (Gregersen et al., 2008). Au contraire, retarder la sénescence foliaire permet de maintenir l'activité photosynthétique de la plante et l'absorption/assimilation des nutriments. Ainsi, la synthèse de molécules carbonées nécessaire à l'élaboration du rendement et l'assimilation de l'azote indispensable pour la synthèse des protéines du grain peuvent se poursuivent efficacement (Nehe et al., 2020).

En dépit des augmentations de rendements, l'évolution des pratiques culturales a aussi eu un effet sur l'accumulation des protéines dans le grain. Entre 1891 et 2010, les teneurs en

protéines ont diminué tout comme les teneurs en gliadines ; à l'inverse, les teneurs en gluténines ont augmenté pendant cette période (Pronin et al., 2020). Ces changements du ratio gliadines/gluténines ont un impact important sur la qualité du grain (Barak et al., 2013). Parallèlement, le consommateur est devenu de plus en plus méfiant vis-à-vis des produits contenant du gluten pour des raisons de santé et de bien-être (Mumolo et al., 2020). L'amélioration des itinéraires techniques doit donc aussi prendre en compte l'aspect qualitatif des produits récoltés pour répondre à la demande du consommateur. Une récente étude a montré l'intérêt des biostimulants pour modifier le profil protéique du blé dur (Pichereaux et al., 2019) suggérant ainsi le potentiel de certains biostimulants pour améliorer les traits liés à la qualité protéique du grain et toutes ses conséquences sur le comportement technologique et la qualité nutritionnelle des produits alimentaires élaborés à partir de la farine de cette céréale.

Dans un contexte de réduction des apports azotés notamment *via* l'optimisation de l'EUA du blé et de prise en compte des préoccupations du consommateur, le recours à des biostimulants en additif des fertilisants azotés représente une alternative très intéressante. En prenant en compte l'ensemble des contraintes environnementales et des attentes de la société, une fertilisation azotée idéale aurait donc les caractéristiques suivantes :

- **Une dose ajustée aux besoins réels de la culture**
- **Une application au moment le plus approprié**
- **Une fertilisation apportée au bon endroit**
- **Un fertilisant efficacement absorbé par la culture**

L'optimisation de ces quatre paramètres correspondant aux « 4R » du système international (Right rate, Right time, Right place, Right fertilizer source) permettra de maximiser la production agricole et sa qualité tout en diminuant les effets néfastes sur l'environnement. Atteindre les objectifs des « 4R » nécessite le développement :

(1) de méthodes et d'outils de diagnostic et d'aide à la décision (satellites, capteurs embarqués, pinces, etc.) qui informent sur le statut nutritionnel de la culture et permettent un pilotage de précision des apports de fertilisants azotés pour les génotypes de blé tendre les plus performants

(2) de formulations d'engrais azotés innovantes comprenant des biostimulants pour améliorer l'EUA et les composantes de rendement et de qualité grainière

Dans ce contexte, la thématique de recherche développée au cours de cette thèse a consisté, dans un premier volet, **à étudier les effets d'un apport de biostimulants en mélange au fertilisant azoté sur l'absorption et la remobilisation de l'azote, le rendement et la qualité grainière chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.).** (Article A publié dans Frontiers in Plant Science : doi: 10.3389/fpls.2020.607615).

Dans un second volet, **une étude approfondie de l'impact des biostimulants les plus prometteurs sur le protéome du grain de blé** a été menée. (Article B soumis le 12 janvier 2021 à Journal of Proteomics).

Afin de valider les résultats obtenus en conditions contrôlées, le troisième objectif de cette thèse a été réalisé **au champ pour évaluer l'effet d'un biostimulant foliaire sur les performances agronomiques du blé dans des conditions pédoclimatiques contrastées.** (Article C publié dans Plants : doi : 10.3390/plants10030456). **Cette étape de validation au champ a aussi été menée pendant deux ans pour mesurer l'impact agronomique d'un biostimulant en tant qu'additif aux fertilisants azotés.** (Article A, et Article D soumis le 12 avril 2021 à European Journal of Agronomy).

Dans un dernier temps**,** l'ensemble des essais ont permis **de calibrer plusieurs outils de diagnostic (SPAD, XRF et NIRS) permettant d'évaluer l'effet des biostimulants sur la teneur en azote des feuilles et les modifications du ionome des grains** (teneurs en P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn et Mn) **et des pailles** (teneurs en P, K, Mg, S, Ca, Fe, Mn et Ni) (Article C). **La prédiction de la teneur en azote du grain et de la feuille drapeau ainsi que du rendement et de certaines de ses composantes a aussi été possible grâce à l'exploitation des spectres de réflectance obtenus par NIRS sur des feuilles drapeaux au stade floraison et des grains matures.** (Article E qui sera soumis en mai 2021 à Field Crops Research).

CHAPITRE III : Matériels et méthodes

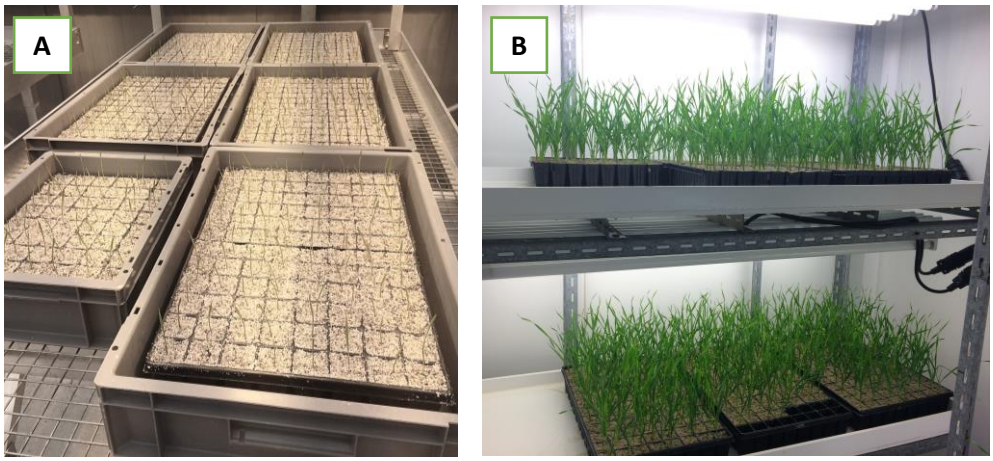


Figure III.1 : Photographie de la culture de blé (A) quelques jours après le semis et (B) pendant la vernalisation.

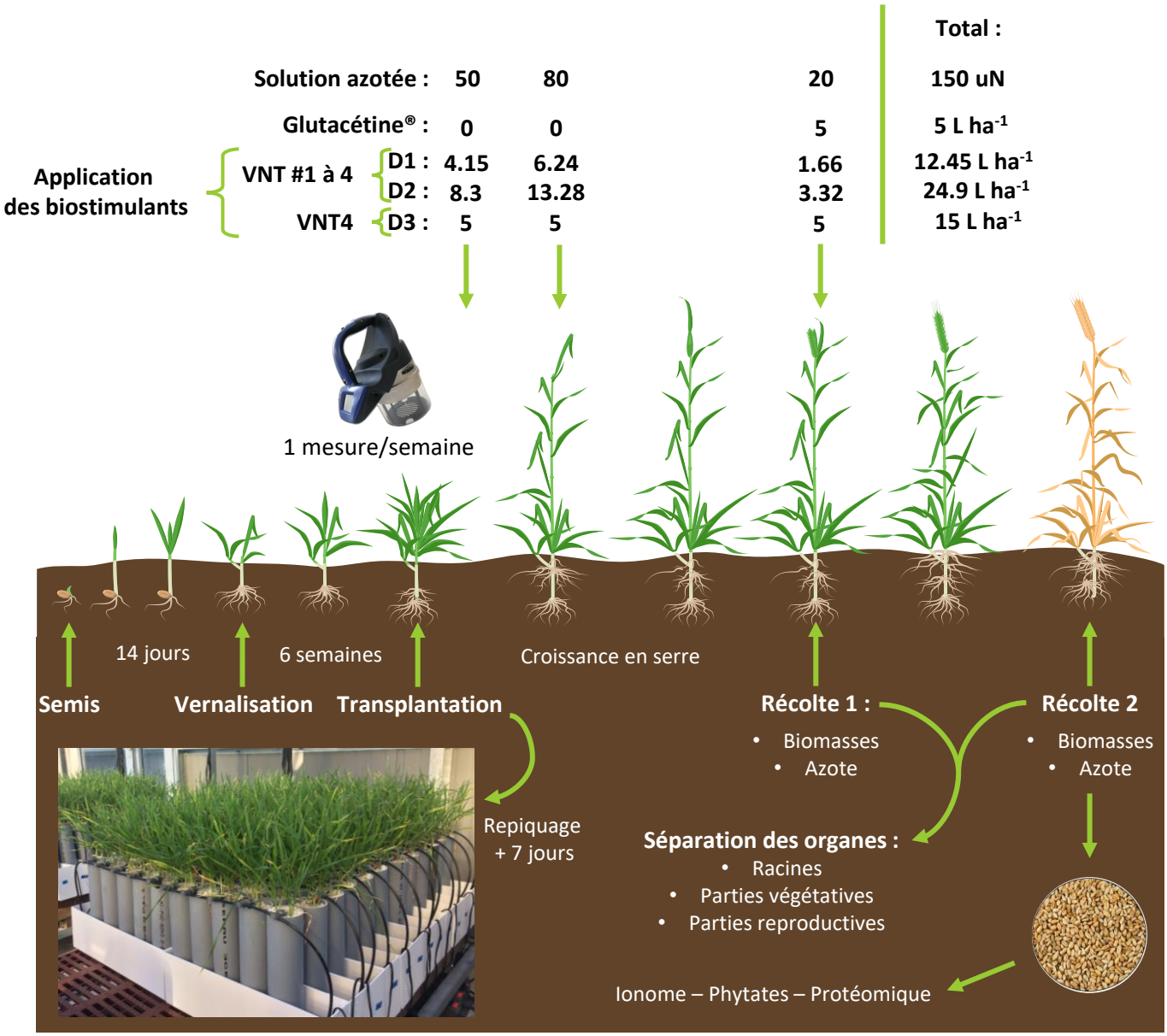


Figure III.2 : Protocole expérimental mis en place en conditions contrôlées pour étudier l'effet des biostimulants en mélange avec la solution azotée sur le blé tendre d'hiver.

CHAPITRE III – MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Conditions de culture et matériel végétal

I.1 Dispositif en conditions contrôlées

Des graines de blé d'hiver (*Triticum aestivum* L.) de la variété Récital ont été semées dans des plateaux de germination contenant un mélange de sable et de vermiculite (2v:1v) et les plantules ont été alimentées avec une solution nutritive Hoagland 25% (1.25 mM $Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$; 1.25 mM KNO_3 ; 0.5 mM $MgSO_4$; 0.25 mM KH_2PO_4 ; 0.2 mM EDTA, 2NaFe, $3H_2O$; 14 mM H_3BO_3 ; 5 mM $MnSO_4$; 3 mM $ZnSO_4$; 0.7 mM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$; 0.7 mM $CuSO_4$; 0.1 mM $CoCl_2$). Ces graines ont été placées pendant deux semaines en conditions contrôlées sous serre : 16 h de jour à 20°C et 8 h de nuit à 16°C (Figure III.1.A). La lumière naturelle était supplémentée par des lampes à sodium haute pression (Philips, MASTER GreenPower T400W) dispensant un rayonnement photosynthétiquement actif (ou PAR Photosynthetically Active Radiation) d'environ 400 µmoles photons s^{-1} m^{-2} au niveau de la canopée. Après la levée, les plantules ont été placées en chambre de vernalisation pendant six semaines à une température de 6°C et une photopériode de 8 h (Figure III.1.B). Après cette période, les plantes ont été transférées dans des tubes en PVC (8 cm de diamètre x 33 cm de hauteur) remplis avec un mélange de sable et de perlite (1v:1v). Le fond de chaque tube était percé pour permettre le drainage de la solution nutritive. Deux plantes ont été transplantées dans chaque tube puis les tubes ont été placées dans des bacs pour obtenir une densité de 250 plantes par m^2 (comparable aux pratiques agronomiques locales). Ce dispositif, complètement randomisé, a été placé en serre chauffée (16 h de jour à 20°C et 8 h de nuit à 16°C). La lumière naturelle était supplémentée par des lampes hautes pressions afin d'assurer un niveau de PAR de 350 µmol s^{-1} m^{-2} au niveau de la canopée. Pendant quinze jours, chaque tube recevait trois fois par jours 30 ml de solution nutritive Hoagland 25% *via* un système d'irrigation automatique (Figure III.2).

A partir du tallage, chaque tube a reçu une solution nutritive sans nitrate : 1.25 mM $CaCl_2$, $2H_2O$; 1.25 mM KCl ; 0.5 mM $MgSO_4$; 0.25 mM KH_2PO_4 ; 0.2 mM EDTA, 2NaFe, $3H_2O$; 14 mM H_3BO_3 ; 5 mM $MnSO_4$; 3 mM $ZnSO_4$; 0.7 mM $(NH_4)_6Mo7O_{24}$; 0.7 mM $CuSO_4$; 0.1 mM $CoCl_2$. La fertilisation azotée a été apportée sous forme de solution azotée (50% urée, 25% nitrate, 25% ammonium) et fractionnée en trois applications : 50 unités (kg N ha^{-1}) au tallage, 80 unités au stade deux nœuds et 20 unités au stade épiaison (Figure III.2). Cinq biostimulants

Table III.1 : Modalité d'application et composition des 5 formulations de biostimulants testées.

		Glutacétine®	VNT1	VNT2	VNT3	VNT4
Modalité d'application		Foliaire	Sol	Sol	Sol	Sol
Acide glutamique (%)		3,6	19,6	10	3,7	3,6
Acide organique (%)		7,4	0	7	5,5	7,4
Sucres solubles totaux (g L^{-1})		22,2	26,5	31,0	25,4	34,4
Eléments (%)	**Cl**	19,8	12,5	17,4	12,0	18,2
	Ca	15,6	11,5	10,1	14,5	13,4
	C	6,26	9,43	14,51	15,53	11,49
	N	0,76	0,72	1,36	1,18	0,88
	K	0,31	0,26	0,23	0,33	0,29
	Na	0,31	0,16	0,14	0,19	0,18
	Mo	0,15	0,19	0,18	0,19	0,18
Eléments (ppm)	**S**	300	130	120	150	140
	B	30	20	20	20	20
	Mg	19	8	7	13	11
	Si	14	11	9	15	11
	P	9,5	9	9,9	10,3	10,2
	Cu	2,6	1	0,8	1,1	1,1
	Ni	1,8	0,6	0,5	0,6	0,6
	Co	0,6	0,5	0,1	0,1	0,4
	Zn	0,3	0,5	1,1	1,8	3,5
	Se	0,08	0,07	0,06	0,04	0,06

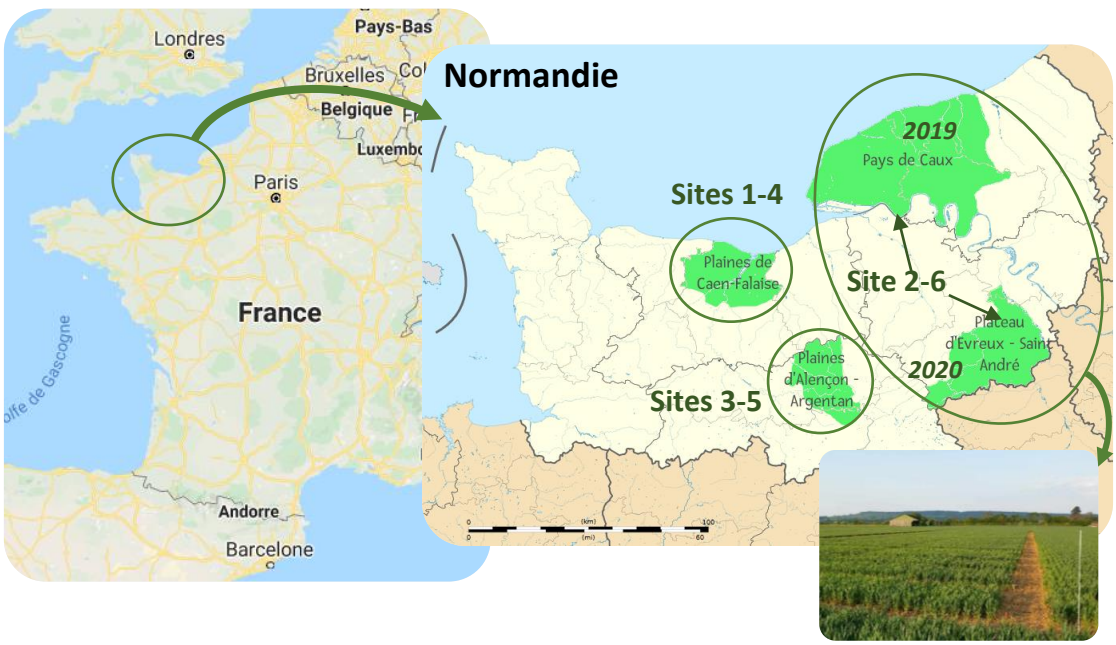


Figure III.3 : Localisation des sites expérimentaux en Normandie (France) permettant d'étudier l'effet des biostimulants sur le blé tendre d'hiver.

ont été testés en tant qu'additif à la solution azotée puis comparés à un témoin (fertilisant seul) : la Glutacétine® (AMM n°1220000, Agent azoto-nutritionnel), VNT1, VNT2, VNT3 et VNT4 fournis par Via Végétale (Le Loroux-Bottereau, France) (Table III.1). Ces formulations contiennent un complexe organo-minéral avec des compositions différentes. La Glutacétine® a été fournie sous forme de poudre ; 3,5 kg ont été dissous dans 5 L d'eau pour préparer la solution mère). La pulvérisation de la Glutacétine® est réalisée uniquement au moment du dernier apport d'azote en apportant l'équivalent de 5 L ha^{-1} sur chaque plante. Pour les autres formulations, il y avait trois doses d'application : la première était de 83 mL par unité d'azote, la seconde de 166 mL par unité d'azote et la dernière était l'équivalent de 3 x 5 L ha^{-1} (Figure III.2). Le niveau de chlorophylles des parties végétatives a été mesuré toutes les semaines (du stade tallage à maturité) grâce au système Multiplex® (Force-A, Orsay, France).

Deux dates de récolte ont été choisies pendant le cycle de croissance : à l'épiaison et à maturité (Figure III.2). Trois tubes de chaque modalité (six plantes) ont été récoltés à ces trois stades pour différentes mesures physiologiques et des analyses élémentaires. Chaque tube était considéré comme une répétition biologique. A la récolte intermédiaire, le nombre d'épis par plante a été mesuré. Les plantes ont ensuite été séparées en trois fractions : les racines, les parties végétatives et les organes reproducteurs. Tous les échantillons ont été séchés à l'étuve (60°C) pendant 48 h avant la mesure de la biomasse sèche. Les échantillons secs ont ensuite été broyés en poudre fine en utilisant un broyeur Retsch MM200 (Eragny sur Oise, France) pour effectuer des analyses élémentaires, des dosages en phytates et des analyses protéomiques (Figure III.2).

I.2 Dispositif au champ

I.2.a Conditions de culture en 2018-2019

Durant l'automne 2018, trois variétés de blé d'hiver (Sacramento, Libravo, et Chevignon) ont été semées sur trois différentes parcelles en Normandie (France) (Figure III.3). La taille des microparcelles était de 24 m^2 (12 m x 2 m) et il y avait trois répétitions par modalité sur chaque site. Le modèle adopté pour l'expérimentation au champ était donc constitué d'un dispositif en 3 blocs complétement randomisés. Entre avril et juin 2019, l'application de produits phytosanitaires a été systématique afin de ne pas introduire de biais expérimental. Les conditions climatiques étaient de 11,9 à 12,4°C (moyenne des

Table III.2 : Caractéristiques des parcelles d'expérimentation et fertilisation azotée appliquée.

Paramètre	2019			2020		
	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6
Précédent cultural	Betterave	Lin	Luzerne	Betterave	Colza	Colza
Variété de blé	Sacramento	Libravo	Chevignon	Adoration	Boregar	Extase
Date de semis	17-11-2018	16-10-2018	16-10-2018	28-12-2019	10-10-2019	25-10-2019
Apport de M.O.	Oui	Non	Non	Non	Non	Non
Type de sol	Limon argileux	Limon profond	Argilo-calcaire	Limon profond	Limon profond	Argilo-calcaire
Effet humus	65	50	30	40	35	25
Effet précédent	20	0	40	20	20	20
Effet apport M.O.	12	0	0	0	0	0
Azote absorbé	10	29	26	0	15	20
Reliquat azoté (NO_3^-/NH_4^+)	33 (25/8)	35 (33/2)	42 (34/8)	30 (26/4)	39 (28/11)	24 (21/3)
Apport total d'azote du sol (kg N ha^{-1})	140	114	138	90	109	89
Besoin de la culture	272	304	270	285	234	288
Azote restant	20	20	20	20	15	20
Besoins totaux	292	324	290	305	249	308
Fertilisation azotée	152	210	152	215 - 40 = 175	132 - 40 = 92	219 - 40 = 179
Apport 1	61	100	62	40 + 77	60	106
Apport 2	31	50	30	18	0	13
Apport 3	60	60	60	40	40	60

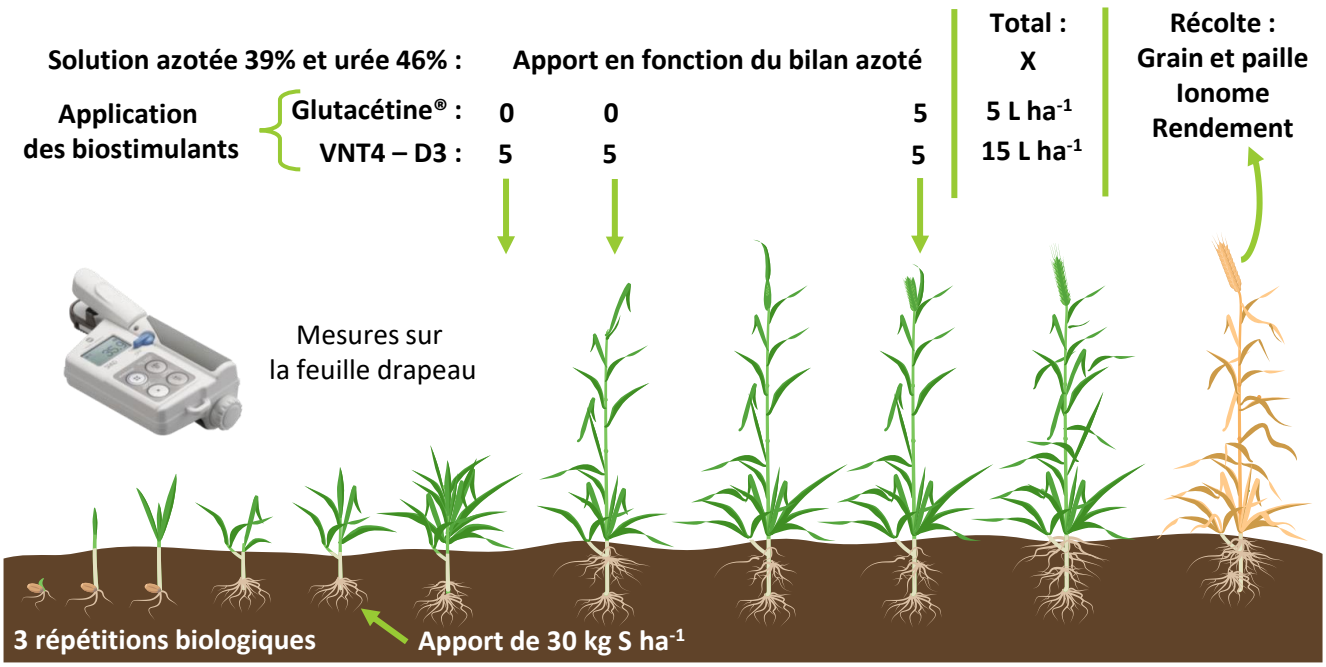


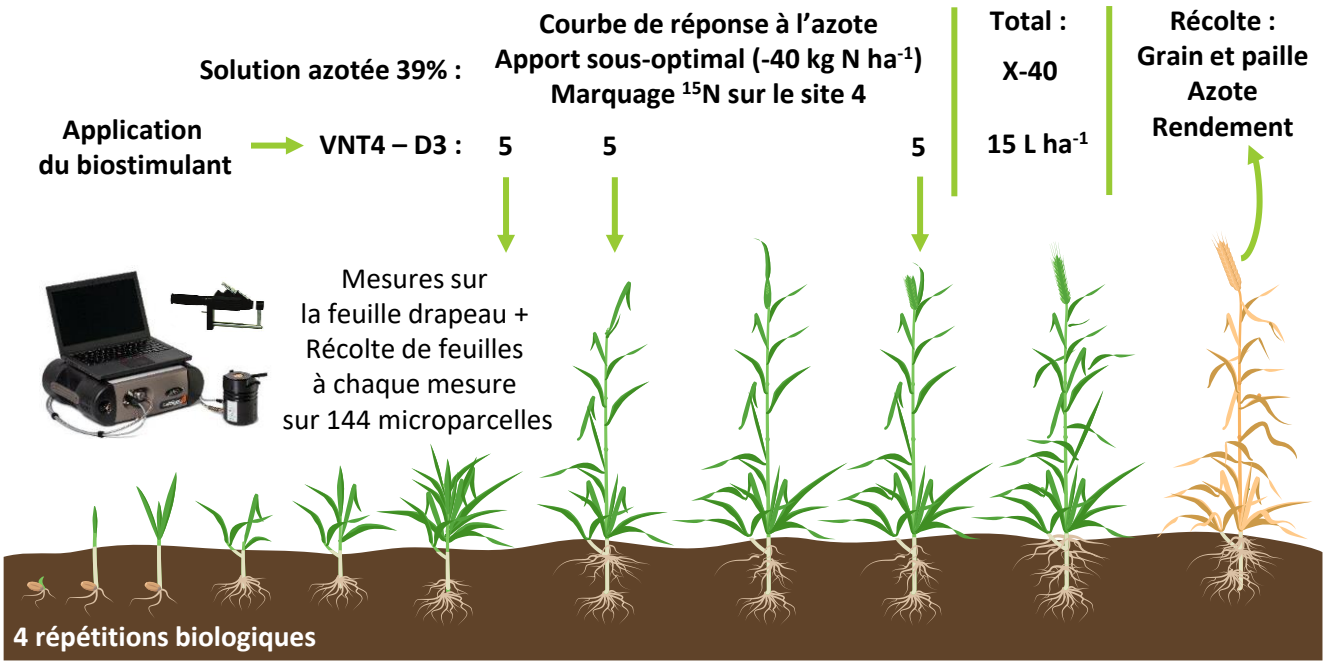
Figure III.4 : Protocole expérimental mis en place au champ en 2018-2019 pour étudier l'effet des biostimulants sur le blé tendre d'hiver. La Glutacétine® a été appliquée seule en foliaire alors que VNT4 a été mélangée au fertilisant azoté à chaque apport.

températures) et de 588 à 611 mm (précipitations totales) entre septembre 2018 et août 2019. Chaque site avait des caractéristiques très différentes (Table III.2).

Toutes les microparcelles ont été fertilisées avec 30 kg de soufre par hectare au stade tallage. L'application des engrais azotés avait pour objectif de répliquer la pratique des agriculteurs et a donc été calculée selon la méthode du bilan (COMIFER, Comité français d'étude et de développement de la fertilisation raisonnée, 2000). Cette méthode mesure la quantité d'azote minérale disponible dans le sol en février pour estimer l'apport total en azote du sol. Avec l'estimation des besoins de la culture en place, la méthode du bilan permet d'appliquer une dose d'azote proche de la demande. Deux formes d'azote ont été utilisées : l'urée 46% et la solution azotée 39%. La dose apportée était de 152, 210 et 152 unités pour les sites 1, 2 et 3, respectivement (Table III.2). Le premier apport a eu lieu au stade tallage, le second pendant la montaison et le dernier au stade dernière feuille étalée (Figure III.4). Pour le dernier apport, le coefficient « bq » d'Arvalis a été suivi pour permettre une croissance optimale de chaque variété avec le double objectif d'optimisation du rendement et de la teneur en protéines (Cohan et al., 2019). Deux biostimulants ont été appliqués de façon différente. La Glutacétine® a fait l'objet d'une pulvérisation foliaire à raison de 5 L ha^{-1} le même jour que le dernier apport d'azote. VNT4 a été mélangé aux fertilisants azotés et appliqué à chaque apport d'azote à raison de 5 L ha^{-1}, soit 3 x 5 L ha^{-1} au total (Figure III.4). Le niveau de chlorophylles a été mesuré à partir du stade dernière feuille étalée jusqu'à post-floraison en utilisant la pince SPAD-502® (Konica Minolta Inc., Japon). Le nombre d'épis par m^2 de chaque microparcelle a été compté sur les trois sites puis les graines et les pailles ont été récoltées. Tous les échantillons ont ensuite été séchés à l'étuve (60°C) pendant 48 h puis broyés en poudre fine pour effectuer des analyses élémentaires.

I.2.b Conditions de culture en 2019-2020

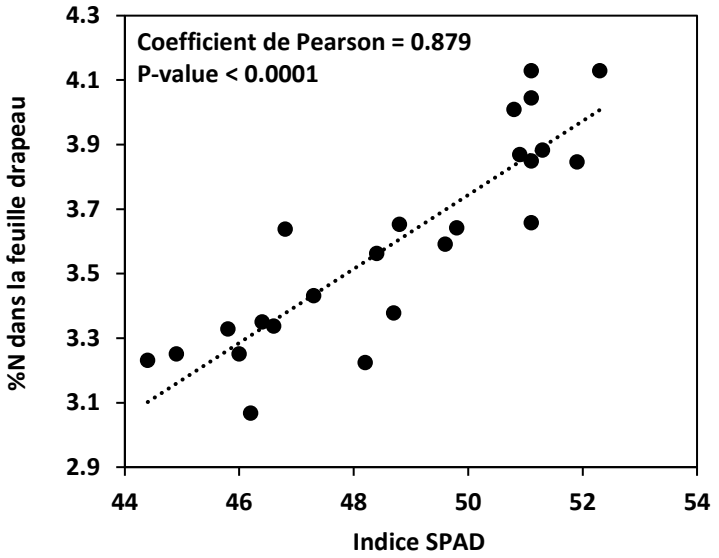
Durant l'automne 2019, trois variétés de blé d'hiver (Adoration, Boregar et Extase) ont été semées sur trois différentes parcelles en Normandie (Figure III.3). La taille des microparcelles était identique à l'année précédente mais le nombre de répétitions par modalité est passé à quatre. Il y avait donc un dispositif en quatre blocs complètement randomisés. Les conditions climatiques étaient de 11,7 à 12,4°C (moyenne des températures) et de 585 à 883 mm (précipitations totales) entre septembre 2019 et août 2020, et chaque parcelle avait des caractéristiques pédoclimatiques très contrastées (Table III.2). Aucun apport



<u>Figure III.5</u> : Protocole expérimental mis en place au champ en 2019-2020 pour étudier l'effet de VNT4 à la dose 3 (3 x 5 L ha^{-1}) en mélange avec la solution azotée sur le blé tendre d'hiver.

de soufre n'a été effectué sur ces cultures. Par ailleurs, la méthode de calcul de la dose d'azote à apporter était la même qu'en 2019 mais les cultures ont été placées en conditions sous-optimales. La dose appliquée a été réduite de 40 unités par rapport à la dose conseillée ; 172, 92 et 179 unités ont donc été apportées sur les sites 4, 5 et 6, respectivement (Table III.2). Une seule forme d'azote a été utilisée en 2020 : la solution azotée, qui a été appliquée aux mêmes stades que l'année précédente. Pour les biostimulants, uniquement VNT4 a été mélangé à la solution azotée selon la même stratégie qu'en 2019. En parallèle, une courbe de réponse à l'azote (témoin non traité, condition sous-optimale, condition optimale et sur-fertilisation) ainsi que d'autres modalités de biostimulants ont été mis en place conduisant à un total de 48 microparcelles sur chaque site. Ces différentes formes et quantités d'azote apportées ont permis d'obtenir une large gamme de teneur en azote dans les feuilles drapeaux et les grains ainsi qu'une forte variabilité en termes de rendement. Des mesures de spectres NIRS ont ensuite été effectuées sur les feuilles drapeaux à partir du stade dernière feuille étalée jusqu'à post-floraison en utilisant le LabSpec® (ASD Inc.) et 20 feuilles ont été récoltées sur chaque microparcelle à chaque mesure (Figure III.5). Le nombre d'épis par m^2 de chaque microparcelle a été compté sur les trois sites puis les graines et les pailles ont été récoltées. Tous les échantillons ont ensuite été séchés à l'étuve (60°C) pendant 48 h puis broyés en poudre fine pour effectuer des analyses élémentaires.

Parallèlement, sur le site 4, un marquage ^{15}N a été effectué sur des microparcelles de 1 m² placées au bout des parcelles de 24 m². Chaque mètre carré a donc reçu de la solution azotée marquée ($^{15}NH_4{}^{15}NO_3$-$CO(^{15}NH_2)_2$, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) ayant un excès isotopique de 2,5atom% ^{15}N avec ou sans VNT4 (5 L ha^{-1} avec chaque apport d'azote). La solution marquée au ^{15}N est préparée dans un volume de 2,5 L afin d'assurer une répartition homogène à la surface du sol de chaque parcelle de 1 m². Une récolte de 0,25 m² a été effectuée après chaque apport d'azote (juste avant la fertilisation suivante) et à maturité afin de pouvoir suivre en dynamique la croissance et l'absorption d'azote et permettre le calcul des indices de récolte. Vingt feuilles ont été récoltées aux stades épiaison et floraison, puis pendant le développement du grain ainsi qu'à maturité. Les graines et les pailles ont aussi été récoltées et tous les échantillons ont été séchés puis broyés pour effectuer des analyses élémentaires.



<u>Figure III.6</u> : Relation entre la teneur en azote de la feuille drapeau mesurée par IRMS et l'indice SPAD.

II. Analyses physiologiques, élémentaires, biochimiques et protéomiques

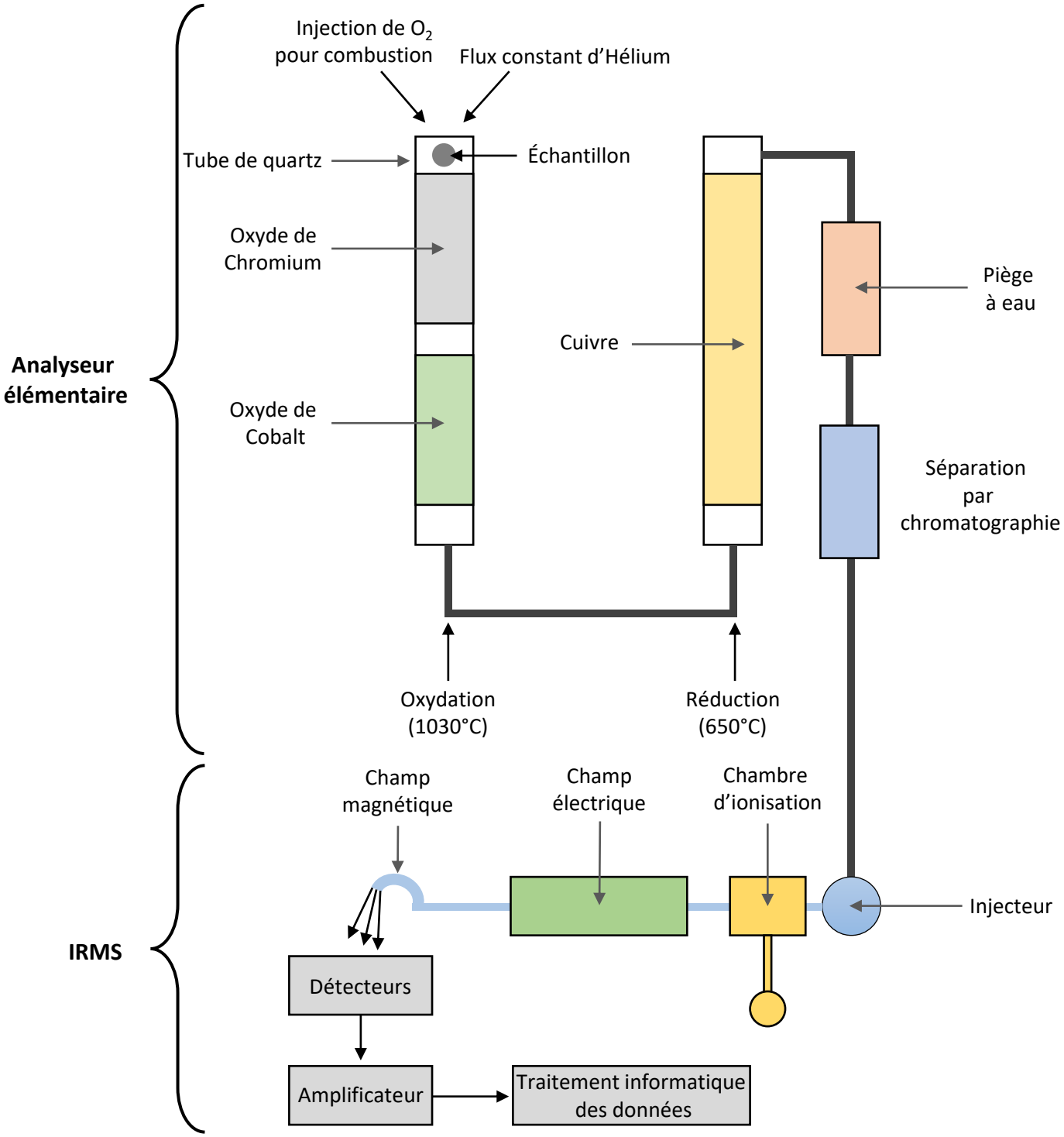
II.1 Estimation de la teneur en azote (Articles A, C et E)

Lors de l'étude en conditions contrôlées (Article A), le système Multiplex® a été utilisé tout au long du cycle de culture afin d'estimer la teneur en azote des parties aériennes du blé. Quatre mesures en continue ont été prises régulièrement sur tous les traitements devant un écran noir afin d'éviter les interférences extérieures. Néanmoins, cet appareil n'a pas pu être utilisé au champ pour avoir des indicateurs fiables. En effet, la corrélation entre les valeurs de l'outil et les teneurs en azote n'était pas suffisante. La mise en place des épis pourrait être à l'origine d'interférences qui rendent les valeurs des indices de chlorophylles et de statut azoté aberrantes. C'est pourquoi, la pince SPAD-502® a été utilisée au champ pour déterminer la teneur en azote des feuilles drapeaux après avoir été calibrée (Figure III.6). Pour chaque microparcelle, la mesure a été prise au milieu de 20 feuilles drapeaux différentes récoltées à différents stades de la culture. Enfin, en 2020, des mesures de spectre de réflectance par NIRS portable ont été prises sur les différentes parcelles afin de calibrer l'appareil et permettre une mesure rapide et fiable de la teneur en azote des feuilles drapeaux. Une feuille drapeau a été mesurée pour chaque microparcelle entre les stades dernière feuille étalée et post-floraison. Ces mesures ont présenté de fortes corrélations avec la teneur en azote des feuilles et ont permis d'établir les équations de prédiction des composantes du rendement et de la teneur en protéines du grain (Article E).

II.2 Analyses élémentaires

II.2.a Analyse de l'azote total par spectrométrie de masse isotopique (IRMS) (Articles A, C, D et E)

L'analyse de l'azote total (^{14}N et ^{15}N) a été réalisée avec un analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Euro Vector, Milan, Italie) couplé à un spectromètre de masse de mesure de ratio isotopique (IRMS). Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme d'isotopie de Normandie (PLATIN') de la SFR ICORE de l'Université de Caen Normandie. Après un broyage fin, les échantillons ont été pesés précisément dans une capsule en étain. Chaque échantillon a ensuite été injecté dans une colonne de combustion (contenant de l'oxyde de chromium et de l'oxyde de cobalt) en présence d'un flux constant d'hélium afin d'éviter les contaminations par le CO_2 et le N_2 de l'atmosphère. Puis les échantillons sont passés à l'état gazeux grâce une



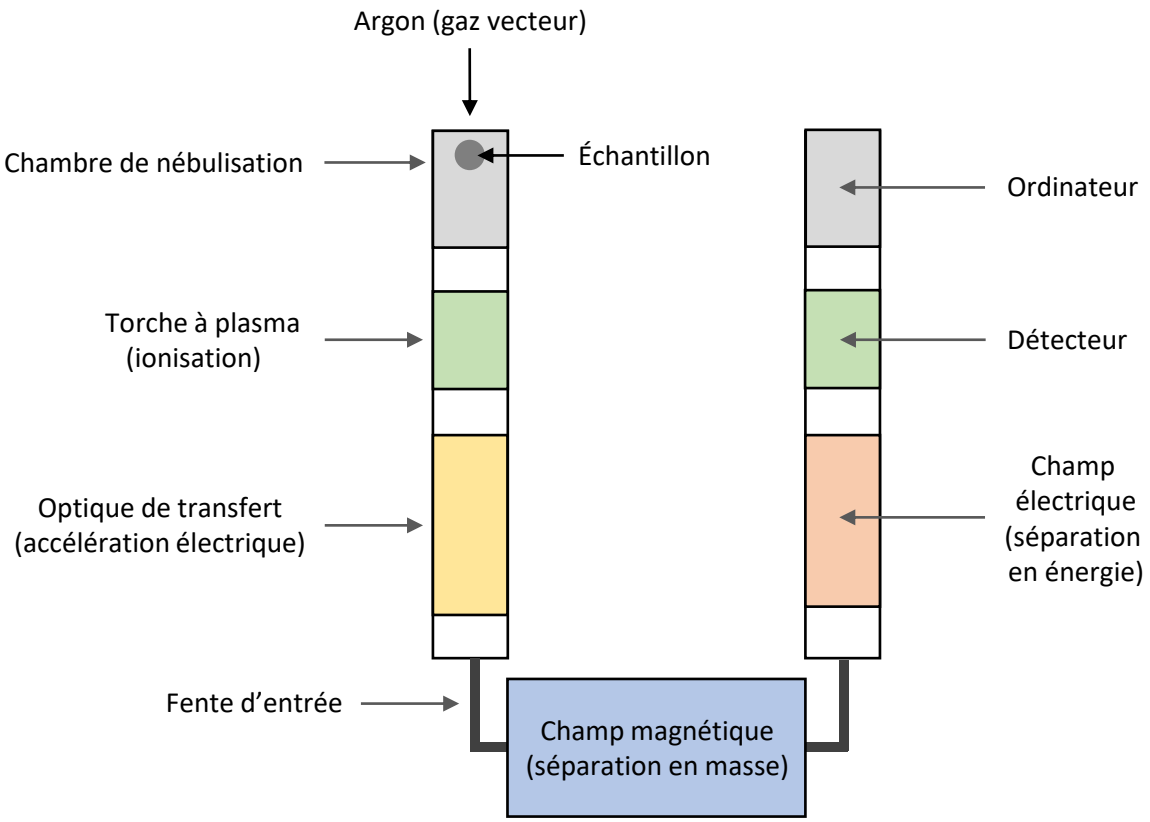
<u>Figure III.7</u> : Analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Eurovector) couplé au spectromètre de masse de ratio isotopique (IRMS, Isotope Ratio Mass Spectometer, Isoprime GV Instrument) utilisé pour déterminer les teneurs en azote et le ratio isotopique $^{15}N/^{14}N$ des échantillons.

combustion totale (1030°C) assurée par un apport d'oxygène en tête de la colonne d'oxydation (Figure III.7). Suite à leur passage dans une colonne de cuivre métallique chauffée à 650°C, les gaz produits à partir des échantillons sont réduits en gaz N_2 et CO_2. L'eau a par ailleurs été piégée au sein d'une colonne contenant du perchlorate de magnésium et du carbosorb®. Le N_2 et le CO_2 ont ensuite été séparés par chromatographie en phase gazeuse à 45°C avant d'être injecté dans le spectromètre de masse (Figure III.7). Ces gaz ont tout d'abord été ionisés puis les ions moléculaires chargés positivement ont été accélérés dans un champ électrique et déviés par un champ magnétique. Leur angle de déviation est directement corrélé au rapport de leur masse sur leur charge. Toutes les molécules de diazote ionisées ont la même charge, leur angle de déviation dépend donc uniquement de leur masse. Par conséquent, la déviation de l'azote moléculaire de masse 28 ($^{14}N^{14}N$) sera plus important que celle de l'azote de masse 29 ($^{14}N^{15}N$), qui elle-même sera plus importante que celle de l'azote de masse 30 ($^{15}N^{15}N$). Les ions ont enfin été collectés par trois détecteurs puis leurs signaux ont été amplifiés et transmis à un système informatique (Figure III.7). La quantification de l'azote a ensuite été réalisée en faisant la somme des signaux obtenus à partir des masses 28, 29 et 30. L'analyseur fournit directement le pourcentage d'azote présent dans l'échantillon. La quantité totale d'azote dans un tissu donné est donc calculée ainsi : Quantité = (%N x MS/100) où MS est la matière sèche de l'échantillon. Le ratio isotopique $^{15}N/^{14}N$ est également déterminé pour calculer les quantités de ^{15}N dans les différents organes du blé et estimer la capacité d'absorption (Cf. Chapitre I.2.b, Expérimentation au champ 2019-2020).

II.2.b Analyses multi-élémentaires

II.2.b.a Par spectrométrie de masse haute résolution à plasma à couplage inductif (ICP-MS-HR) (Articles A et C)

Le ionome (K, P, S, Mg, Ca, Na, Fe, Zn, Mn, Cu, Mo, B, Cd et Se) de la farine et de la paille de blé a été analysé par ICP-MS-HR à partir de 40 mg de matière sèche. Ces analyses ont aussi été réalisées sur la plateforme d'isotopie de Normandie (PLATIN') de la SFR ICORE de l'Université de Caen Normandie. Après un broyage fin, les échantillons ont été minéralisés grâce à de l'acide nitrique (HNO_3) et de l'eau oxygénée (H_2O_2). Plus précisément, 900 µL d'eau ultrapure, 800 µL de HNO_3 et 200 µL de H_2O_2 ont été ajoutés au 40 mg de farine de blé contenus dans un tube en téflon de 50 mL. Puis, 100 µL de solution contenant les standards internes ont été ajoutés (Gallium : 10 ppm, Rhodium : 3 ppm, Iridium : 2 ppm). Les tubes en téflon ont ensuite été mis au four à micro-ondes pendant 47 minutes (min) pour être



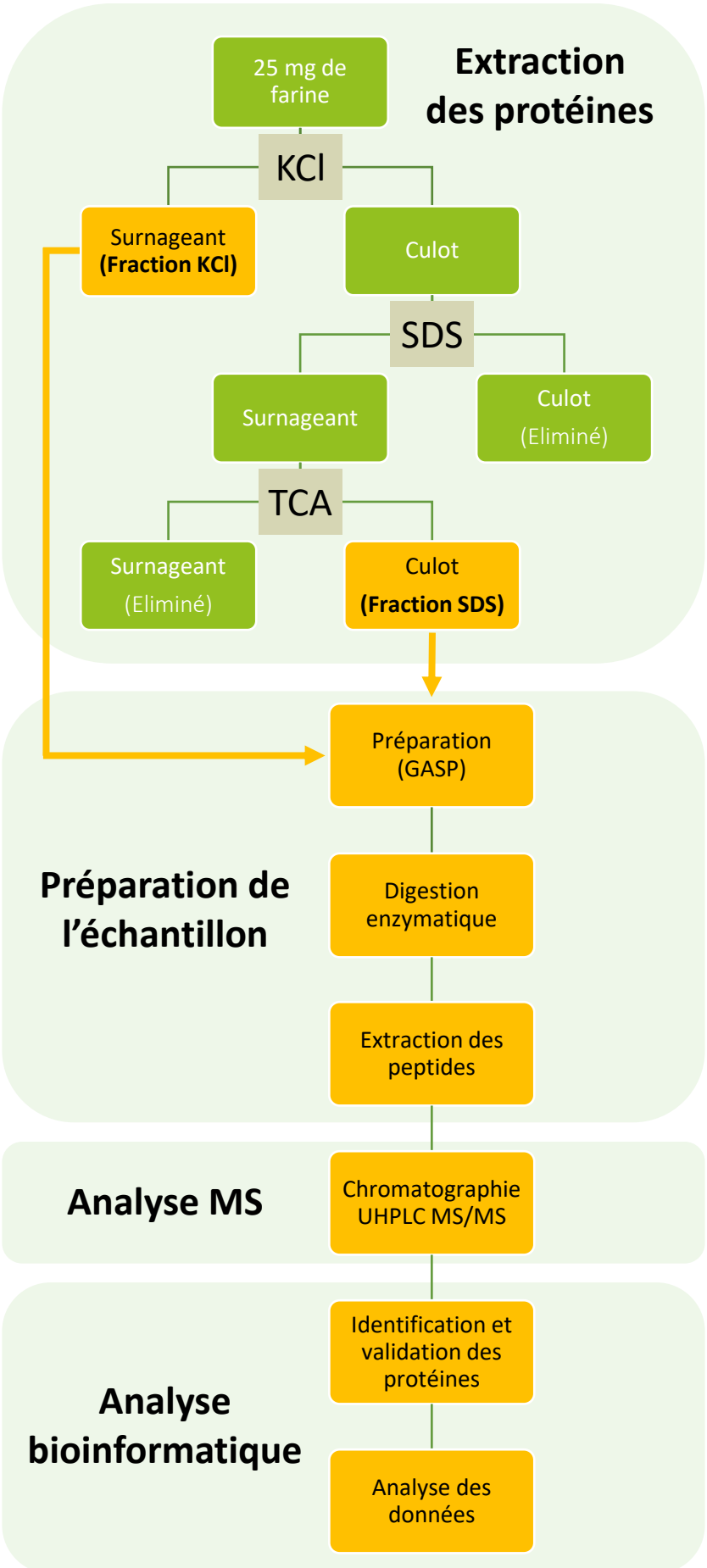
<u>Figure III.8</u> : Principe de fonctionnement et trajet des ions en ICP-MS-HR Element 2™ (Thermo Fisher Scientific).

minéralisés en quatre étapes : 5 min d'augmentation de la température pour atteindre 130°C, 2 min à cette température, 5 min d'augmentation de la température pour atteindre 190°C et 35 min à cette température. Les tubes ont été refroidis pendant 20 min puis repris dans 50 mL d'eau ultrapure et filtrés sur un filtre à téflon de 0,45 µm avant d'être analysés à l'aide d'un ICP-MS-HR Element 2^{TM} (Thermo Fisher Scientific, France) (Figure III.8).

L'échantillon est prélevé par une aiguille pour être déposé dans la chambre de nébulisation cyclonique où il est nébulisé en fines gouttelettes. L'argon (gaz vecteur) entraine avec lui environ 6 µL de l'échantillon dans la torche à plasma qui ionise l'échantillon. Les ions subissent ensuite une accélération électrique et transitent vers un champ magnétique dans lequel ils sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge (Figure III.8). Puis, ils traversent un champ électrique qui éliminent les ions de trop faible énergie cinétique avant d'arriver au détecteur. Ce détecteur mesure un nombre de coups par seconde qui est proportionnel à la teneur de l'élément dans l'échantillon. Le signal est ensuite envoyé à un système informatique pour calculer les teneurs relatives en ions (Figure III.8).

II.2.b.b Par fluorescence à rayon X (Article C)

Les échantillons de farine de blé issus de l'expérimentation en conditions contrôlées et des pailles issus des essais au champ ont aussi été analysés *via* l'utilisation d'un système d'analyse élémentaire par fluorescence à rayons X (spectromètre XRF portatif S1 TITAN 800, Bruker). Cet appareil a été conçu en premier lieu pour des applications en géologie et utilisé comme outil de détection d'une très large gamme d'éléments chimiques dont la masse molaire atomique est supérieure ou égale au magnésium (24,3 g mol^{-1}) *via* la fluorescence émise par la matière testée suite à une excitation par des rayons X. La détermination de la composition élémentaire par le système XRF nécessite de définir préalablement des équations d'étalonnage de l'appareil pour chaque élément chimique et chaque type de matrice (liquide, poudre végétale, feuille intacte, etc.). Les réglages de l'appareil XRF ont permis d'optimiser les mesures élémentaires en choisissant une configuration de détection de type « GeoChem - GeoChem Trace » avec une phase de détection des éléments lourds de 4 secondes et une phase de détection des éléments légers de 60 secondes, soit 64 secondes par mesure XRF. Cet appareil a pu quantifier de nombreux éléments de la farine (K, P, Mg, S, Ca, Fe, Zn et Mn) et de la paille de blé (K, P, Mg, S, Ca, Fe, Mn et Ni) (Cf. Article C). Les coefficients de calibration ont été définis *via* une équation de la droite d'étalonnage déterminée par corrélation entre



<u>Figure III.9</u> : Diagramme du dispositif expérimental mis en place pour l'extraction et l'analyse protéomique de la farine de blé.

les teneurs variables en éléments mesurées par XRF et celles obtenues sur les mêmes échantillons par ICP-MS-HR (Figure III.9 et 10).

II.3 Dosage de la teneur en phytates de la farine (Article A)

Les phytates étant des facteurs antinutritionnels, leur teneur dans la farine de blé a été analysée selon la méthode proposée par Haug and Lantzsch (1983). Le dosage de l'acide phytique est basé sur la précipitation du phytate ferrique et sur la mesure du fer restant dans le surnageant. Environ 40 mg de farine ont été utilisés pour l'extraction de l'acide phytique dans 2 mL de HCl 0,2 N pendant 2 h. La solution a ensuite été centrifugée pendant 20 min. Puis, 900 µL de HCl 0,2 N et 2 mL de solution ferrique ($NH_4Fe\ (SO_4)_2$, 12 H_20) ont été ajoutés au surnageant (100 µL) et l'ensemble a été placé dans un bain marie pendant 30 min. Après refroidissement, 1,5 mL de solution de 2,2'-bipyridine a été ajoutée à 1 mL de surnageant pour mesurer le fer restant dans le surnageant. La couleur rose résultante, directement proportionnelle à la teneur en phytates, est analysée par mesure de l'absorbance à 524 nm à partir d'une courbe d'étalonnage (0, 25, 50, 100 et 200 mg L^{-1}).

II.4 Analyse protéomique de la farine (Articles A et B)

Afin d'effectuer une analyse protéomique, les protéines des grains de blé ont été extraites selon la méthode proposée par Hurkman and Tanaka (2006) (Figure III.9). 25 mg de farine ont été ajoutés dans 100 µL de tampon KCl froid (5 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 5 mM EDTA, pH 7,8) à 4°C pendant 5 min. L'échantillon a ensuite été centrifugé pendant 15 min et le surnageant a été récupéré (fraction KCl). Puis, 400 µL de tampon SDS (2% SDS, 10% glycérol, 50 mM DTT, 40 mM Tris–HCl, pH 6,8) ont été ajoutés au culot pour une incubation d'une heure à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant a été récupéré et mélangé à 40 µL (10% v/v) de TCA froid 72% pour une incubation de 2 h à 4°C. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé, le culot a été rincé trois fois avec de l'acétone glacé, séché à température ambiante puis repris dans le tampon SDS (fraction SDS). La teneur en protéines de ces deux fractions a ensuite été analysée grâce à un dosage Bradford (Bradford, 1976) avant de réaliser l'analyse du protéome sur la plateforme Proteogen de la SFR ICORE de l'Université de Caen Normandie.

Pour l'analyse protéomique, 5 µg de chaque échantillon ont été préparés selon un protocole GASP (Gel-aided sample preparation) modifié (Fischer and Kessler, 2015) avant d'être digérés par un cocktail enzymatique de Lysine C et trypsine à 37°C pendant une nuit

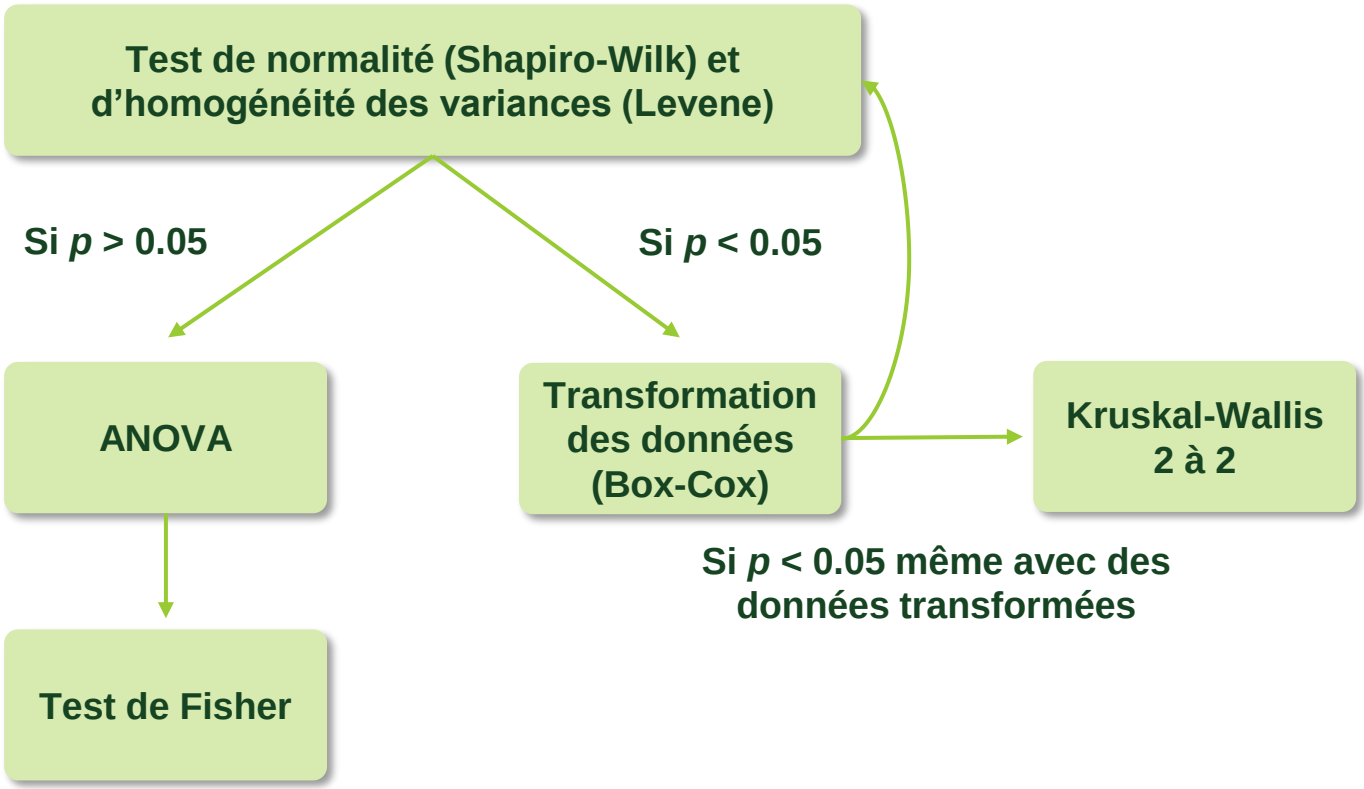


Figure III.10 : Méthodologie statistique utilisée pour le traitement des données.

(Figure III.9). Les peptides libérés suite à cette digestion protéolytique sont ensuite concentrés en micro-colonne C18 avant injection. Dans un premier temps, les peptides sont fractionnés grâce à un système de chromatographie à nanoflux ultra haute pression (UHPLC NanoElute, Bruker Daltonics) selon un gradient de 100 min : tampon A contenant de 2 à 15% de tampon B en 60 min, augmentation à 25% de tampon B en 30 min puis à 37% en 10 min, suivi par une étape de lavage à 95% de tampon B avant rééquilibration (tampon A : solution aqueuse à 0,1% d'acide formique ; tampon B : solution d'acétonitrile à 0,1% d'acide formique) à un débit de 400 nL min^{-1}. Les analyses en spectrométrie de masse sont réalisées sur un instrument de type TIMS-TOF Pro (Bruker Daltonics) en mode PASEF, dans la gamme de masse/charge 100-1700, avec exclusion des ions monochargés. L'appareil est calibré, chaque semaine, avec une précision de masse supérieure à 1 ppm.

Les données ainsi obtenues sont dans un premier temps analysées par le logiciel Preview (ProteinMetrics) afin d'estimer la qualité de la digestion enzymatique réalisée et de prédire les modifications post-traductionnelles présentes. La recherche en banque est ensuite réalisée par le logiciel Peaks X+ sur la base des fragmentations obtenues en MS/MS en utilisant le protéome actualisé de *Triticum aestivum* (UniProt). Les modifications « non fixes » sélectionnées pour l'identification étaient les suivantes : oxydation (M), acétylation (K) et déamidation (NQ). La modification propionoamide (C) a été paramétrée « fixe ». Le paramètre trypsine est sélectionné et l'erreur de masse est fixée à 20 ppm en MS (Mass Spectrometry) et 0,05 Dalton en MS/MS. La quantification relative par méthode Label Free (LFQ) et l'analyse statistique sont réalisées dans Peaks X+ en sélectionnant un ratio de 1,5 et une qualité supérieure à deux.

III. Méthodologie statistique

Les résultats sont exprimés par la moyenne des valeurs obtenues pour l'ensemble des répétitions biologiques (n=3 ou n=4) ± l'erreur standard (SE). La normalité et l'homogénéité des données ont été vérifiées en utilisant le test de Shapiro-Wilk et le test de Levene, respectivement (Figure III.10). Quand les données avaient une distribution normale, des analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées pour évaluer l'effet de chaque paramètre et leurs interactions. Le test de Fisher ($p < 0,05$) a ensuite été utilisé pour effectuer des comparaisons de moyennes entre traitements (logiciel R, version 3.3). Quelques jeux de données ont été transformés en utilisant la méthode Box-Cox (logiciel XLSTAT) pour obtenir une distribution normale et appliquer l'ANOVA et le test de Fisher (Figure III.10). Lorsque les

données ne respectaient pas la loi normale, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé ($p < 0,05$).

CHAPITRE IV : Résultats

CHAPITRE IV – RÉSULTATS

A. Effets du biostimulant Glutacétine® et de ses formulations dérivées en mélange au fertilisant azoté sur l'absorption post-épiaison et la remobilisation de l'azote, le rendement et la qualité du grain chez le blé d'hiver

***Frontiers in Plant Science*, 2020, https://doi.org/10.3389/fpls.2020.607615**

Contexte : De nombreuses études montrent les effets bénéfiques de l'application de biostimulants sur les plantes notamment sur l'efficience d'usage de l'azote (EUA), alors que les pertes d'azote induisent des problèmes économiques et environnementaux. Le blé est une céréale très cultivée qui contribue à nourrir une grande partie de la population mondiale même si ses rendements ont tendance à stagner. Il est donc important de continuer à améliorer la productivité du blé en optimisant l'efficacité d'utilisation des fertilisants azotés apportés. Les biostimulants peuvent être un moyen d'augmenter l'absorption et l'efficience de remobilisation de l'azote chez le blé. Cela pourrait conduire à une augmentation significative de l'EUA, du rendement en grain et de la qualité grainière.

Objectif : Le but de ces travaux est d'étudier l'effet de l'apport de formulations à base de Glutacétine® en mélange avec le fertilisant azoté sur l'EUA, la productivité et la qualité du grain chez le blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum* L.).

Démarche expérimentale : Un biostimulant foliaire (Glutacétine® à 5 L ha^{-1} en mélange avec le troisième apport d'engrais) et quatre biostimulants en application au sol (VNT1 à 4) sont testés à trois doses différentes (83 mL kg N^{-1}, 166 mL kg N^{-1} ou 3 x 5 L ha^{-1}) en mélange aux trois apports de solution azotée (50, 80 et 20 kg N ha^{-1} aux stades tallage, deux nœuds et épiaison, respectivement). Les paramètres de croissance et d'absorption d'azote ont été suivis, notamment avec des récoltes destructives à épiaison et maturité. La formulation VNT4 a ensuite été testée une première année au champ dans trois parcelles aux caractéristiques pédoclimatiques contrastées.

Principaux résultats : Cette étude montre que les biostimulants à base de Glutacétine® augmente l'absorption d'azote post-épiaison et l'efficience de remobilisation de l'azote grâce à une sénescence accélérée. Parallèlement, l'application des biostimulants induit l'augmentation du nombre de grains par épi, ce qui se traduit par un meilleur « fruiting efficiency ». L'optimisation de l'EUA a permis d'accroitre le rendement et l'azote total dans les grains surtout pour VNT4 à la dose 3 (en serre et au champ). Enfin, la qualité grainière a été fortement modifiée par les formulations notamment avec la baisse de la teneur en phytates et des changements au niveau du ionome. Par ailleurs, plusieurs protéines de réserve, dont les α-/β-gliadines, ont été affectées par la pulvérisation de Glutacétine®.

A. Biostimulant effects of Glutacetine® and its derived formulations mixed with N fertilizer on post-heading N uptake and remobilization, seed yield and grain quality in winter wheat

Victor Maignan [1,2], Benoit Bernay [3], Patrick Géliot [2] and Jean-Christophe Avice [1]

[1] Normandie Univ, UNICAEN, INRAE, UMR EVA, SFR Normandie Végétal FED4277, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen, France

[2] Via Végétale, 44430 Le Loroux-Bottereau, France

[3] Plateforme Proteogen, SFR ICORE 4206, Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la paix, 14032, Caen cedex, France

Keywords: plant biostimulants, nitrogen fertilizer, *Triticum aestivum*, nitrogen remobilization, senescence, phytate, iron bioavailability, grain quality

Abstract

Biostimulants could play an important role in agriculture particularly for increasing N fertilizer use efficiency which is essential for maintaining both yield and grain quality in bread wheat, which is a major global crop. In the present study, we examined the effects of mixing urea-ammonium-nitrate fertilizer (UAN) or urea with 5 new biostimulants containing Glutacetine® or its derivative formulations (VNT1, 2, 3 and 4) on the physiological responses, agronomic traits, and grain quality of winter wheat. A first experiment under greenhouse conditions showed that VNT1, VNT3 and VNT4 significantly increased the seed yield and grain numbers per ear. VNT4 also enhanced total plant nitrogen (N) and total grain N, which induced a higher N Harvest Index (NHI). The higher post-heading N uptake (for VNT1 and VNT4) and the acceleration of senescence speed with all formulations enabled better nutrient remobilization efficiency, especially in terms of N mobilization from roots and straw toward the grain with VNT4. The grain ionome was changed by the formulations with the bioavailability of iron improved with addition of VNT4, and the phytate concentrations in flour were reduced by VNT1 and VNT4. A second experiment in 3 contrasting field trials confirmed that VNT4 increased seed yield and N Use Efficiency. Our investigation reveals the important role of these new formulations in achieving significant increases in seed yield and grain quality.

I. Introduction

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is the largest primary commodity and a major global cereal crop, with production of approximately 700 Mt annually that provides 19% of the world's total available calories (FAOSTAT, 2020). China is the primary producer (112 Mt) before India (78 Mt), the USA (58 Mt), Russia (49 Mt) and France (36 Mt). Farm-gate yields worldwide have increased over the past half century to the current 3 t ha^{-1} (Hawkesford, 2017). In highly productive temperate areas, for example in France, farm-gate yields are 9 t ha^{-1}, but with an apparent plateauing in recent years (Brisson et al., 2010). Due to economic and ecological factors, there is a trend in Europe to limit chemical inputs for wheat, especially N (Boisson et al., 2005), despite it being essential for both maximal yield and optimal quality in terms of protein content. Seed yield and grain protein concentration are two major challenges in winter wheat, as these traits are dominant determinants of the economic value of the harvested product (Pan et al., 2020). Protein content influences price, especially due to its impact on the rheological qualities of flour (Nadaud et al., 2015). However, there is a strong negative relationship between seed yield and grain N concentration (Bogard et al., 2010; Brisson et al., 2010; de Oliveira Silva et al., 2020). In wheat, 60-90% of the grain N derives from remobilization of stores accumulated in vegetative organs prior to flowering. In contrast, the N taken up during the post-flowering period represents between 5 and 40% of the total grain N under field conditions (Oscarson, 2000). The relative contribution of this later N source to grain N is strongly influenced by the environment and especially by the availabilities of N and water in the soil (Miller et al., 2007). Under controlled conditions where environmental constraints are minimized, wheat has the ability to take up N until close to grain maturity (Glass, 2009; Masclaux-Daubresse et al., 2010). It is also well documented that post-flowering N uptake has a strong impact on the grain N concentration in wheat (Oscarson, 2000; Taulemesse et al., 2015). Interestingly, focusing on the post-flowering period, numerous studies have been undertaken on senescence processes in wheat and their importance in N use efficiency (NUE) (Distelfeld et al., 2014; Gaju et al., 2014; Gregersen et al., 2008; Hebbar et al., 2014). Indeed, nutrient allocation is a dynamic phenomenon, achieved by nutrient recycling and linked to processes of development including senescence and remobilization (Hawkesford et al., 2018). During senescence, proteins are degraded, and nutrients are remobilized from senescing organs toward developing grain (Gregersen et al., 2008). A balance between senescence timing and speed, grain nutrient content, nutrient use efficiency,

Table IV.A.1 : The chemical composition of the tested formulations.

Component		Glutacetine®	VNT1	VNT2	VNT3	VNT4
Type of application		Foliar	Soil	Soil	Soil	Soil
Glutamic acid (%)		3.6	19.6	10	3.7	3.6
Organic acids (%)		7.4	0	7	5.5	7.4
Total soluble sugars (g L^{-1})		22.2	26.5	31.0	25.4	34.4
Elements (%)	**Cl**	19.8	12.5	17.4	12.0	18.2
	Ca	15.6	11.5	10.1	14.5	13.4
	C	6.26	9.43	14.51	15.53	11.49
	N	0.76	0.72	1.36	1.18	0.88
	K	0.31	0.26	0.23	0.33	0.29
	Na	0.31	0.16	0.14	0.19	0.18
	Mo	0.15	0.19	0.18	0.19	0.18
Elements (ppm)	**S**	300	130	120	150	140
	B	30	20	20	20	20
	Mg	19	8	7	13	11
	Si	14	11	9	15	11
	P	9.5	9	9.9	10.3	10.2
	Cu	2.6	1	0.8	1.1	1.1
	Ni	1.8	0.6	0.5	0.6	0.6
	Co	0.6	0.5	0.1	0.1	0.4
	Zn	0.3	0.5	1.1	1.8	3.5
	Se	0.08	0.07	0.06	0.04	0.06

and seed yield needs to be considered to improve wheat production and its quality components. In this regard, the effectiveness of remobilization strongly influences performance and quality, particularly grain protein and mineral nutrient content, which are important health and quality attributes of the seeds. The nutrient remobilization efficiency is an essential component of nutrient use efficiency, an important sustainability trait (Avice and Etienne, 2014; de Oliveira Silva et al., 2020).

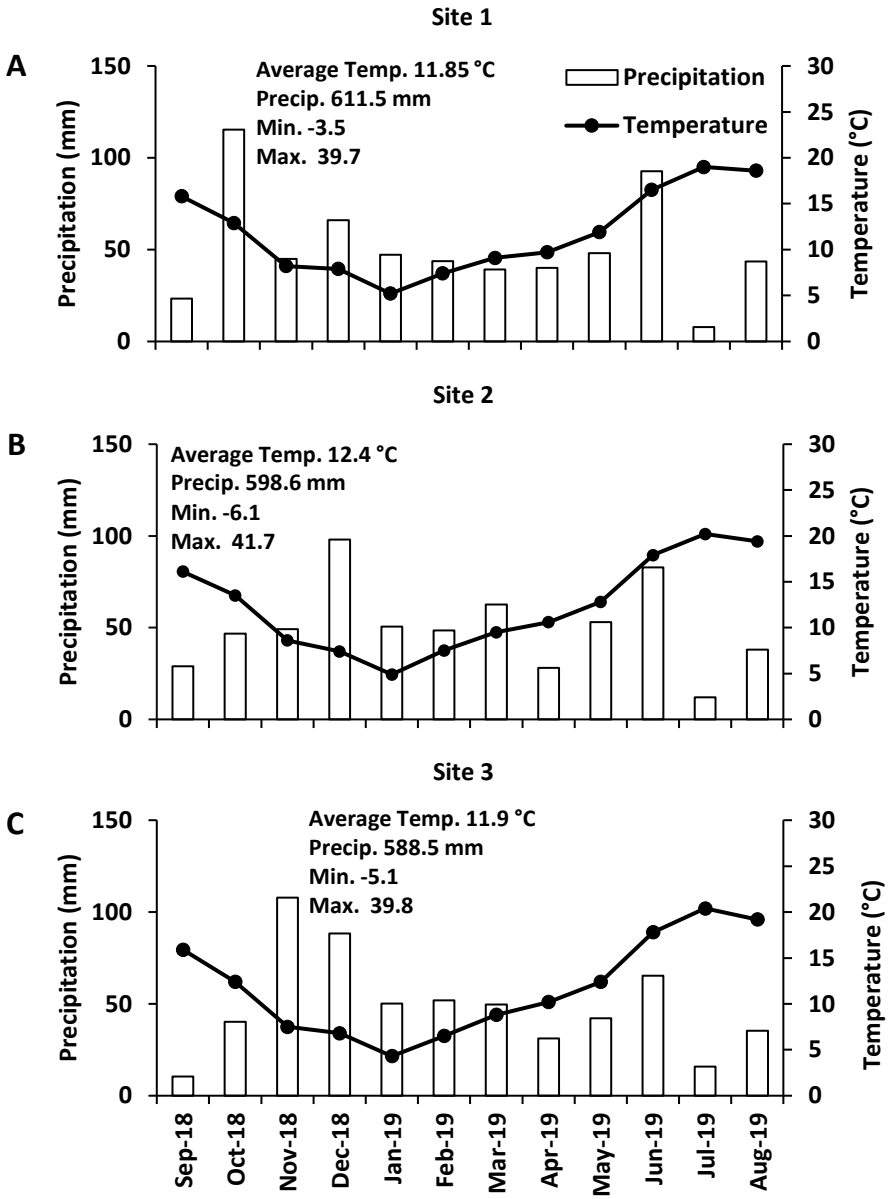
N is essential to synthesize seed storage proteins in wheat such as glutenin or gliadins (Dupont et al., 2006). Because they contribute to baking quality, a balanced mixture of these components is crucial (Barak et al., 2013). However, these proteins are also related to celiac disease (Gell et al., 2017; Perrin et al., 2019) and especially the α-gliadins (Sollid et al., 2012; Zörb et al., 2013). A downregulation of these proteins, while still maintaining dough proprieties, might be a solution for celiac disease patients (Altenbach et al., 2020). Beyond N, mineral nutrients in grain act as a source of micronutrients in the human diet, among which deficiencies in key minerals including calcium (Ca), magnesium (Mg), copper (Cu), iron (Fe), and zinc (Zn) have prompted efforts to increase their concentrations in seeds (Hussain et al., 2012; Kutman et al., 2010; Ramzani et al., 2016; Rehman et al., 2018; Wang et al., 2020). In the last few decades, it has been well established that wheat is a crucial source of Fe and Zn for humans (Ciccolini et al., 2017; Singh et al., 2018; Uauy et al., 2006), but the concentrations of these minerals in flour are generally low (Sobolewska et al., 2020) and their bioavailability is limited by high phytate content (Ficco et al., 2009; Xue et al., 2015). Phytic acid is linked to mineral deficiency because of its high affinity with minerals, mainly Fe, Zn, Ca and Mg (Ficco et al., 2009). Therefore, fertilization strategies improving the nutritional value of wheat grain might allow production of mature seeds with high concentrations of beneficial micronutrients and low contents of phytate (Safar-Noori et al., 2018) or toxic micronutrients such as cadmium (Cd). Indeed, Cd is toxic for humans and notably damages kidney function, even at very low concentrations (Huang et al., 2020; Järup L et al., 1998). Many areas of arable soil in the world are contaminated by Cd through the use of sludges, phosphate fertilizers or irrigation water containing Cd (McGrath et al., 2001). In this regard, it is very important to reduce the accumulation of Cd in wheat grain to below the maximum concentration of 0.2 µg Cd g^{-1} allowed in Europe (Commission Regulation, 2006). One way to minimize the Cd loaded into wheat grain is to adapt mineral nutrition (Sarwar et al., 2010; Yan et al., 2018), such as N (Gray

<u>Supplementary Table IV.A.1</u> : Location, wheat cultivars and soil properties of the 3 field trials (Exp. 2)

	Site 1	**Site 2**	**Site 3**
Location	49.26491, -0.87763	49.512660, 0.409829	48.851115,0.023732
Previous crop	*Beta vulgaris*	*Linum usitatissimum*	*Medicago sativa*
Wheat cultivar	Sacramento	Libravo	Chevignon
Sowing date	17-11-2018	16-10-2018	16-10-2018
Organic matter input	Yes	No	No
Soil type	Clay loams / Frank loams	Deep silt	Superficial clay limestone
pH (water)	6.2	7.3	8.4
CEC (mol kg^{-1})	9.5	8.5	10.8
Organic matter (%)	2.4	2.1	3.4
C/N Ratio	Not determined	8.1	7.6
Total N (%)	Not determined	0.15	0.26
Organic C (%)	1.42	1.22	1.98
Available P (ppm)	132	101	62
Exchangeable K (ppm)	168	238	254
Exchangeable Mg (ppm)	104	99	216
CaO (‰)	2.1	3.6	12.3

et al., 2002), phosphorus (Gao and Grant, 2012), silicon (Rizwan et al., 2012) or micronutrients (Huang et al., 2020). Thus, management of nutrient inputs that impact senescence processes could affect the loading of Cd into seeds.

One way to reduce N fertilizers without dramatically affecting grain yields is to improve the N recycling and remobilization performance of plants. Enhanced-efficiency fertilizers such as those containing nitrification inhibitors and urease inhibitors have been developed to increase NUE and reduce N losses by increasing the congruence between N supply and crop N demand (Abalos et al., 2014). However, these inhibitors could also have a negative impact on plant metabolism (Artola et al., 2011; Zanin et al., 2016) and affect the activity of soil microorganisms (Castellano-Hinojosa et al., 2020; Guardia et al., 2018). More recently, solutions classified as plant growth stimulants have been studied (Calvo et al., 2014; Chiaiese et al., 2018; Colla et al., 2014; Paul et al., 2019; Popko et al., 2018). A plant biostimulant is any substance or microorganism applied to plants with the aim to enhance nutrition efficiency, abiotic stress tolerance or crop quality traits, regardless of its nutrient content (du Jardin, 2015). The role of biostimulants is to control and accelerate the life processes of plants, increase the resistance to stress and stimulate their development (Calvo et al., 2014). These products are also safe for the environment and contribute to sustainable, high-output low-input crop production (du Jardin, 2015). Their application helps to reduce the amount of chemicals used in agriculture. Among biostimulants, plant extracts, amino acids and beneficial elements have been widely studied (Rouphael and Colla, 2020). Biostimulants based on proteins or amino acids have enhanced N metabolism (Di Mola et al., 2020; Hassan et al., 2020), crop yield, grain characteristics, and the content of macro- and micronutrients in winter wheat (Popko et al., 2018). Regarding quality traits, plant biostimulants could affect wheat grain properties, changing the grain proteome (Pichereaux et al., 2019). Mineral interactions are also known to be essential for improving mineral use efficiency. Moreover, it is well documented that the actions of N and S fertilizers are strongly linked and impact seed yield components and quality (Guerrini et al., 2020; Poisson et al., 2019). Other elements, such as Ca (Liu et al., 2020), chloride (Cl) or boron (B) facilitate N assimilation (Bielski et al., 2020; López-Lefebre et al., 2000) and stimulate N metabolism (Wang et al., 2019) even under abiotic stresses (Arshi et al., 2006; Das et al., 2016; Kaczmarek et al., 2016). Designing and developing new biostimulants or enhanced-efficiency fertilizers is a crucial process that requires an



<u>Supplementary Figure IV.A.1</u> : Weather conditions between September 2019 and August 2020 in the 3 experimental sites. (A) Site 1, (B) Site 2 and (C) Site 3.

accurate testing of the product's effects on the morpho-physiological traits of plants, and a deep understanding of their mechanism of action.

The aim of the present study was to determine the effect of new additives to N fertilizers on NUE, yield and grain quality in winter wheat. To address this goal, two experiments were carried out for determination of relevant impacts of news additives on physiological, agronomic and grain quality parameters. Firstly, an experiment under semi-hydroponic conditions was performed in a greenhouse, using local fertilization practices with the 5 organo-mineral additives (Table IV.A.1 for more details about the composition of formulations) mixed with N fertilizers (to form an enhanced-efficiency fertilizer) and applied at three different growth stages (GS) to achieve the equivalent of 150 kg N ha^{-1}. A second experiment was carried-out under three contrasting field conditions, in order to test the impact of the more promising formulation identified in the experiment 1 (i.e., the formulation VNT4) mixed with urea or UAN solution (50% urea, 25% NO_3^-, 25% NH_4^+).

II. Materials and methods

II.1 Experiment under greenhouse conditions (Experiment 1)

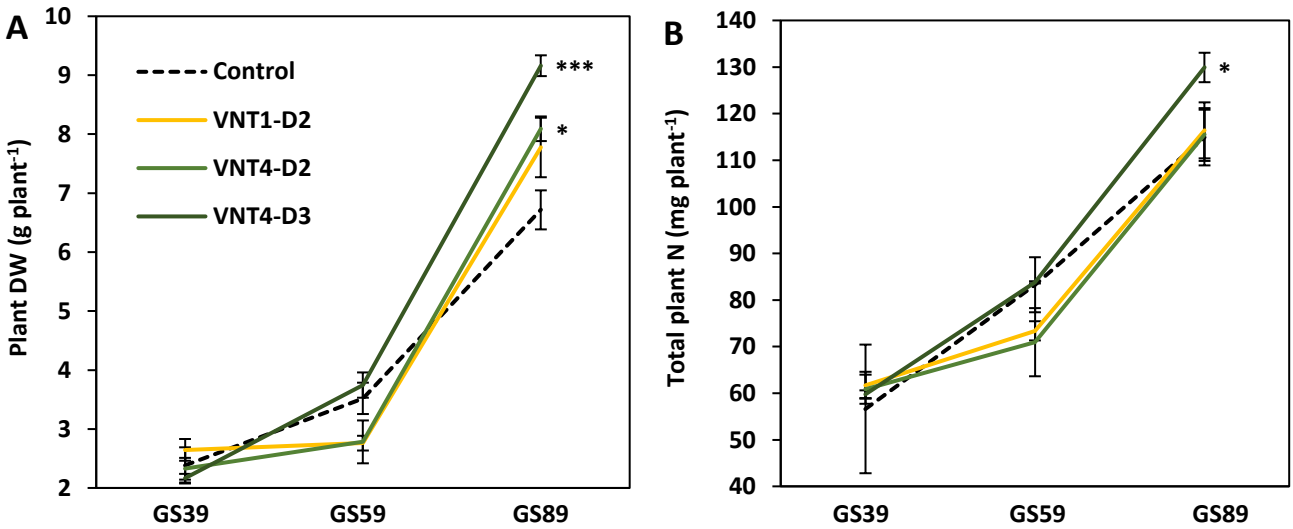
II.1.a Experimental design and tissue sampling

Winter wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Récital) was sown in germination trays filled with a sand and vermiculite mixture (2v:1v) supplied with 25% Hoagland nutrient solution [1.25 mM $Ca(NO_3)_2, 4H_2O$; 1.25 mM KNO_3; 0.5 mM $MgSO_4$; 0.25 mM KH_2PO_4; 0.2 mM EDTA, 2NaFe, $3H_2O$; 14 µM H_3BO_3; 5 µM $MnSO_4$; 3 µM $ZnSO_4$; 0.7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$; 0.7 µM $CuSO_4$; 0.1 µM $CoCl_2$] and placed for 2 weeks under greenhouse conditions (16 h light at 20°C, 8 h dark at 16°C). Natural light was supplied by high-pressure sodium lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W). After emergence, plants were vernalized in a growth chamber (6°C, photoperiod 8 h) for 6 weeks. Following vernalization, plants were transplanted into PVC tubes (8 cm diameter x 33 cm high) filled with a sand:perlite mixture (1v:1v) for semi-hydroponic culture. The bottom of each pot was perforated to allow excess nutrient solution to drain. Two plants were transplanted into each tube and tubes were placed vertically in containers (5 tubes per container) in order to obtain a plant density of 250 plants m^{-2}, which is comparable to the density usually observed in the field under local agronomic practices.

Containers were placed in a heated greenhouse (16 h light at 20°C, 8 h dark at 16°C) and completely randomized. Natural light was supplied by high-pressure sodium lamps

Supplementary Table IV.A.2 : Nitrogen management in the 3 field trials (Exp. 2)

	Site 1	Site 2	Site 3
Humus effect	65	50	30
Previous crop effect	20	0	40
M.O. supply effect	12	0	0
N uptook	10	29	26
N residue (NO_3^-/NH_4^+)	33 (25/8)	35 (33/2)	42 (34/8)
Total N soil supply (kg N ha^{-1})	140	114	138
Crop needs	272	304	270
N remaining	20	20	20
Total needs	292	324	290
N fertilization	152	210	152
Supply 1	61	100	62
Supply 2	31	50	30
Supply 3	60	60	60



Supplementary Figure IV.A.2 : Effect of biostimulant formulations mixed with N fertilizer on plant DW and total plant N at the tillering, heading and maturity stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). (A) Plant dry weight dynamics, and (B) total plant N dynamics. Plant culture was carried out under semi-hydroponic conditions on a sand/perlite (1/1) substrate (see Materials and methods for details). N was provided at tillering (eq. 50 kg N ha^{-1}), 2 nodes (eq. 80 kg N ha^{-1}) and heading (eq. 20 kg N ha^{-1}) stages. VNT1 and VNT4 (see Table IV.A.1 for composition of each) were mixed with N fertilizer at different doses: dose 2 was 166 ml kg N^{-1} and dose 3 was the equivalent of 3 x 5 L ha^{-1}. Dose 3 was tested only with VNT4. Plants were harvested at emergence of the last visible leaf (GS39), heading (GS59) and maturity (GS89). Bars indicate means ± SE. Different letters denote significant differences according to Fisher's test ($p < 0.05$; n = 3).

(Philips, MASTER GreenPower T400W) with a PAR of 350 µmol m^{-2} s^{-1} at canopy height. During the first 15 days, each tube received 30 ml of a 25% Hoagland nutrient solution three times a day *via* an automated micro-irrigation system coupled with a percolate recycling system. After tillage, each tube received nutrient solution without NO_3^- [1.25 mM $CaCl_2$, $2H_2O$; 1.25 mM KCl; 0.5 mM $MgSO_4$; 0.25 mM KH_2PO_4; 0.2 mM EDTA, 2NaFe, $3H_2O$; 14 µM H_3BO_3; 5 µM $MnSO_4$; 3 µM $ZnSO_4$; 0.7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$; 0.7 µM $CuSO_4$; 0.1 µM $CoCl_2$]. UAN solution (50% urea, 25% NO_3^-, 25% NH_4^+) was split into 3 inputs: 50 units (UN: kg N ha^{-1}) at the tillering stage (GS29), 80 units at the 2-node stage (GS32) and 20 units at the heading stage (GS59). Five additives to fertilizers (Glutacetine® and VNT #1 to #4 provided by Via Végétale, Le Loroux-Bottereau, France) were tested in the present study and then compared with a control (N fertilizer alone). These formulations contain organo-mineral complexes with different compositions (Table IV.A.1). Glutacetine® was provided as a powder and 3.5 kg was dissolved in 5 L (mother solution) to be sprayed on one hectare as recommended by Via Végétale. After dilution of 20 µl of mother solution in 25 ml ultrapure water, this formulation was applied using a sprayer on 5 tubes (10 plants). Finally, each plant received with 2.5 ml of Glutacetine® formulation only during the last N fertilizer application (the first two applications were added to the substrate without Glutacetine®). There were 3 doses of the formulations applied: the first dose was 83 ml UN^{-1}, the second was 166 ml UN^{-1} and the third was the equivalent of 3 x 5 L ha^{-1} (dose 3 was tested only with VNT4). The chlorophyll levels in vegetative parts were measured each week from the tillering (GS29) to maturity (GS89) stages with an optical sensor system (Multiplex® fluorometer, Force A, Orsay, France).

Three sampling dates were chosen during the growth cycle. The first destructive sampling took place at emergence of the last visible leaf (GS39), the second at heading (GS59) and the last at maturity (GS89). Each sampling was made at the same time of the day (1-2 h after the start of the light period). On each sampling date, three tubes (6 plants) of each treatment were collected for physiological measurements and elemental analyses. Each tube (two plants) was considered as a biological replicate. At the intermediate harvest, the number of spikes were measured. The plants were then separated into three fractions: roots, vegetative aerial parts, and reproductive organs. All samples were dried in an oven (60°C) for 48 h before dry weight (DW) measurement. Dry samples were ground to a fine powder using

Supplementary Table IV.A.3 : Analysis of variance of greenhouse experiment (Exp. 1). *** : P < 0.001, ** : P < 0.01 and * : P < 0.05.

		Treatment	Dose	Treatment*Dose
Figure IV.A.1.1	Plant DW		**	
	Seed Yield	*	**	
	Root DW			
	Straw DW		**	
	Grain number spike^{-1}		**	
	Fruiting efficiency	***	***	*
Figure IV.A.1.2	Total plant N			
	N Harvest Index	*	**	
	Total grain N		**	
	%N in grain DW			
	%N in root DW	***	***	
	%N in straw DW		*	
Figure IV.A.1.3	Post-heading N uptake	***		
	Senescence speed	***	***	***
	%N remobilized from roots	***	***	
	%N remobilized from straws	**	***	*
Figure IV.A.1.4	Phytate content in grain			
	Phytate / Zn molar ratio			
	Phytate / Fe molar ratio			
Table IV.A.1.2	Harvest index	*		
	Spike number / plant			
	Grain number / plant		*	
	1000 grains weight	*		*
	Specific weight			
	Protein content			
	N Use Efficiency		**	
Table IV.A.1.3	K content in grains			
	P content in grains	*		
	S content in grains			
	Mg content in grains		*	
	Ca content in grains			
	Na content in grains		**	
	Fe content in grains			
	Zn content in grains			
	Mn content in grains			
	Cu content in grains		*	*
	Mo content in grains	**		
	B content in grains			
	Cd content in grains	***		*
	Se content in grains	**		
Supplementary Figure IV.A.3	Total N at heading	***	**	
	N amount grain^{-1}			
	Grain N-to-S ratio			

Retsch MM200 mixer mill (Eragny sur Oise, France) for elemental, phytate and proteomic analyses.

II.1.b Determination of leaf senescence speed and components of N use efficiency

Senescence speed was expressed as the slope of decrease in chlorophyll index between the end of flowering (GS69) and maturity (GS89) stages.

The relative concentrations of total N in the different tissues were determined using a C/N/S analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) connected to a continuous flow isotope mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV Instruments, Manchester, UK). Based on the N contents, the N harvest index (NHI) and N use efficiency (NUE) were calculated. The NHI corresponds to the ratio between the N amounts in seeds and the total N amount in the plant at the final harvest. NUE is expressed as the grain DW produced per gram of N provided by fertilizers. Post-heading N uptake was calculated by the difference between total N at maturity and total N at heading stage. The level of N remobilization in the grain was estimated as the percentage of N remobilized in roots and vegetative parts between the heading stage and maturity: %N remobilized = [(Total organ N at heading / Total organ N at maturity) / Total organ N at heading)] x 100. When calculation of the percentage of N remobilized produced a negative value, N remobilization was considered as 0%.

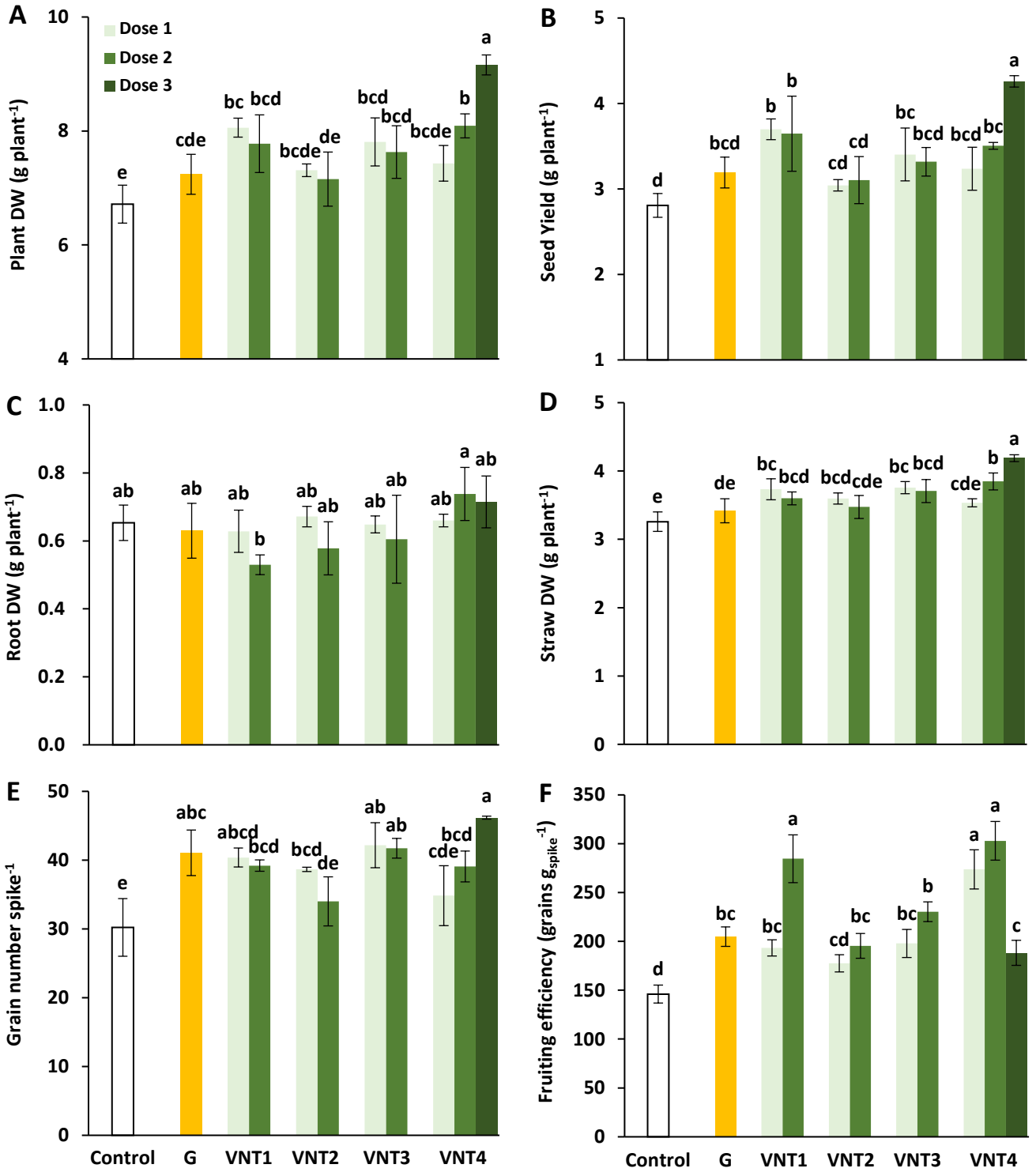
II.1.c Seed yield components

After the last harvest of winter wheat, the number of grains per spike, thousand grain weight (TGW in g), the harvest index (grain DW divided by total DW), specific weight (grain density, kg hl^{-1}) and protein content (N x 5.7 %) were determined. Fruiting efficiency was also calculated as the number of grains per unit of spike DW at anthesis (Slafer et al., 2015).

II.1.d Components of grain quality

II.1.d.a Ionomic analysis and phytate contents in seeds

K, P, S, Mg, Ca, Na, Fe, Zn, Mn, Cu, Mo, B, Cd, and Se in the wheat grain were quantified by inductively high-resolution coupled plasma mass spectrometry (HR ICP-MS, Thermo Scientific, Element 2^{TM}) with prior microwave acid sample digestion (Multiwave ECO, Anton Paar, les Ulis, France) (800 µl of concentrated HNO_3, 200 µl of H_2O_2 and 1 ml of Milli-Q water for 40 mg DW). For the determination by HR ICP-MS, all the samples were spiked with two internal-standard solutions of gallium and rhodium for final concentrations of 10 and 2 µg l^{-1}, respectively, diluted to 50 ml with Milli-Q water to obtain solutions containing 2.0% (v/v) nitric



<u>Figure IV.A.1</u> : Effect of biostimulant formulations mixed with N fertilizer on plant dry weight (DW), seed yield, root DW, straw DW, grain number per spike and fruiting efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). (A) Plant dry weight, (B) seed yield, (C) root dry weight (D) straw dry weight, (E) grain number per spike and (F) fruiting efficiency. Plant culture was carried out under semi-hydroponic conditions on a sand/perlite (1/1) substrate (see Materials and methods for details). N was provided at tillering (eq. 50 kg N ha^{-1}), the 2 nodes (eq. 80 kg N ha^{-1}) and heading stages (eq. 20 kg N ha^{-1}). Glutacetine® (G) was mixed with N fertilizer at the heading stage at a dose of 5 L ha^{-1} and applied as a foliar treatment. Four other formulations (VNT1, VNT2, VNT3 and VNT4, see Table IV.A.1 for composition of each) were mixed with N fertilizer at different doses: dose 1 was 83 ml kg N^{-1}, dose 2 was 166 ml kg N^{-1} and dose 3 was the equivalent of 3 x 5 L ha^{-1}. Dose 3 was tested only with VNT4. Plants were harvested at maturity (GS89). Bars indicate means ± SE. Different letters denote significant differences according to Fisher's test ($p < 0.05$; n = 3).

acid, then filtered at 0.45 µm using a Teflon filtration system (Filtermate, Courtage Analyses Services, Mont-Saint-Aignan, France). Quantification of each element was performed using external standard calibration curves. The amount of a given element, *E*, was calculated from DW, and element concentration (%*E* as % of DW) as: $E = (\%E \times DW) / 100$.

Because the level of phytate is considered as a quality trait of wheat grain (the lower the better), phytate content was performed following the methodology proposed by Haug and Lantzsch (1983). The phytic acid assay was based on precipitation of ferric phytate and measurement of iron (Fe) remaining in the supernatant. This method was slightly modified in the present study. About 40 mg of ground wheat grain was used for extraction of phytic acid in 2 ml of 0.2 N HCl for 2 h and were then centrifuged at 4600 × g for 20 min. The supernatant (100 µl) was treated with 900 µl of 0.2N HCl and 2 ml of ferric solution ($NH_4Fe(SO_4)_2$, 12 H_2O) in a boiling water bath for 30 min. After cooling, 1 ml of supernatant was treated with 1.5 ml 2,2'-bipyridine solution to measure the Fe remaining in the supernatant. The resulting pink colour was read at 524 nm from a standard curve (0, 25, 50, 100 and 200 mg L^{-1}).

II.1.d.b Seed proteomic analysis

Proteins were extracted from 25 mg of wholemeal flour milled for 5 min at 4°C in cold KCl (50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 5 mM EDTA, pH 7.8). The sample was then centrifuged for 15 min (12 000 rpm, 4°C) and supernatant 1 was collected. 400 µl of SDS sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 40 mM Tris-Cl, pH 6.8) were added to the pellet for 1 h of incubation at ambient temperature. After centrifugation, the supernatant was collected and 40 µl (10% v/v) of cold TCA 72% was added for 2 h of incubation at 4°C. After centrifugation, the resulting pellet was washed three times in ice-cold acetone then dried at room temperature and finally added to supernatant 1 for Bradford analysis and SDS-PAGE electrophoresis (20 µg protein). For nano-LC fragmentation, protein or peptide samples were first desalted and concentrated onto µC18 Omix pipette tips (Agilent) before analysis. The chromatography step was performed on a NanoElute (Bruker Daltonics) ultra-high pressure nano flow chromatography system. Peptides were concentrated onto a C18 pepmap 100 (5 mm x 300 µm i.d.) precolumn (Thermo Scientific) and separated at 50°C onto a reversed phase Reprosil column (25 cm x 75 µm i.d.) packed with 1.6 µm C18 coated porous silica beads (Ionopticks). Mobile phases consisted of 0.1% formic acid, 99.9% water (v/v) (A) and 0.1% formic acid in 99.9% ACN (v/v) (B). The nanoflow rate was set at 400 nl min^{-1}, and the gradient

Table IV.A.2 : Influence of formulations on harvest index, spike number per plant, grain number per plant, 1000 grain weight, specific weight, protein content and N use efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.).

		Harvest index	Spike number/plant	Grain number/plant	1000 grain weight (g)	Specific weight (kg hl^{-1})	Protein content (%)	N Use Efficiency
Control		0.42 ± 0.003b	3.00 ± 0.35	88.67 ± 3.05e	33.02 ± 1.77a	70.75 ± 1.62b	14.17 ± 0.23a	6.97 ± 0.24bc
Glutacetine®		0.44 ± 0.018ab	2.83 ± 0.20	115.83 ± 9.04bcd	28.97 ± 2.46bc	71.58 ± 0.95ab	13.22 ± 0.49ab	7.40 ± 0.38bc
VNT1	**Dose 1**	0.46 ± 0.015a	3.17 ± 0.20	127.50 ± 4.78ab	30.37 ± 1.51abc	72.46 ± 0.90ab	12.54 ± 0.32b	8.13 ± 0.22b
	Dose 2	0.47 ± 0.028a	3.00 ± 0.00	117.50 ± 13.31bcd	32.46 ± 1.38a	73.29 ± 0.72a	12.48 ± 0.37b	7.99 ± 1.02bc
VNT2	**Dose 1**	0.42 ± 0.004b	3.00 ± 0.00	116.00 ± 0.94bcd	27.34 ± 0.45c	72.75 ± 0.72ab	13.28 ± 0.22ab	7.09 ± 0.15bc
	Dose 2	0.43 ± 0.014ab	3.00 ± 0.00	102.00 ± 10.73de	32.04 ± 1.50ab	73.83 ± 1.20a	12.62 ± 0.77b	6.85 ± 0.60c
VNT3	**Dose 1**	0.43 ± 0.017ab	3.00 ± 0.00	126.50 ± 9.82ab	28.17 ± 0.65c	72.96 ± 0.44ab	12.67 ± 0.34b	7.55 ± 0.57bc
	Dose 2	0.44 ± 0.006ab	3.00 ± 0.00	125.17 ± 4.28ab	27.81 ± 1.22c	72.54 ± 1.35ab	13.03 ± 0.92ab	7.55 ± 0.19bc
VNT4	**Dose 1**	0.43 ± 0.017ab	3.00 ± 0.00	104.50 ± 13.08ab	32.54 ± 1.93a	73.46 ± 0.54a	12.86 ± 0.64b	7.32 ± 0.80bc
	Dose 2	0.43 ± 0.011ab	3.17 ± 0.20	123.17 ± 0.54abc	29.84 ± 0.39abc	73.21 ± 1.18a	12.54 ± 0.25b	7.71 ± 0.08bc
	Dose 3	0.46 ± 0.002a	3.00 ± 0.00	138.50 ± 0.71a	32.10 ± 0.43ab	72.96 ± 0.57ab	12.62 ± 0.19b	9.42 ± 0.24a

Values indicate means ± SE. Different letters denote significant differences according to Fisher's test ($p < 0.05$; n = 3).

profile was as follows: from 2 to 15% B within 60 min, followed by an increase to 25% B within 30 min and further to 37% within 10 min, followed by a washing step at 95% B and re-equilibration.

Mass spectrometry (MS) experiments were carried out on a TIMS-TOF pro mass spectrometer (Bruker Daltonics) with a modified nano electrospray ion source (CaptiveSpray, Bruker Daltonics). The system was calibrated each week and mass precision was better than 1 ppm. A 1600 spray voltage with a capillary temperature of 180°C was typically employed for ionizing. MS spectra were acquired in the positive mode in the mass range from 100 to 1700 m/z. In the experiments described here, the mass spectrometer was operated in PASEF mode with exclusion of single charged peptides. A number of 10 PASEF MS/MS scans was performed for 1.16 seconds from charge range 2-5. The fragmentation pattern was used to determine the sequence of the peptide. Database searching and label-free quantification (LFQ) were performed using Peaks X software. A Uniprot *Triticum aestivum* (including 105 061 entries) database was used. The variable modifications allowed were as follows: C-carbamidomethyl, C-propioamide, K-acetylation, methionine oxidation, and deamidation (NQ). “Trypsin” was selected as semispecific. Mass accuracy was set to 20 ppm and 0.05 Da for MS and MS/MS mode, respectively. Data were filtered according to a peptide false discovery rate (FDR) of 1%, ≥ 2 unique peptides per protein and the elimination of protein redundancy on the basis of proteins being evidenced by the same set or a subset of peptides. For LFQ, the Peaks Q method was used with TIC as the normalization factor and quality > 5. Peptide detection was required in a least two samples per group, and modified forms were excluded. A 1.5-fold increase in relative abundance and a significance of ≥ 20 were used to determine enriched proteins. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium *via* the PRIDE (Perez-Riverol et al., 2019) partner repository with the dataset identifier PXD021512.

II.2 Experiment under field conditions (Experiment 2)

During autumn 2018, three different cultivars of winter wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Sacremento, Libravo and Chevignon) were sown at three different sites in Normandy, France (see Supplementary Table IV.A.1 for more details), which belong to the oceanic temperate region. Plot size was 24 m² (12 m x 2 m) and three replicates (plots) were used per treatment at each site. The plots were randomized in three main blocks. During April 2019 –

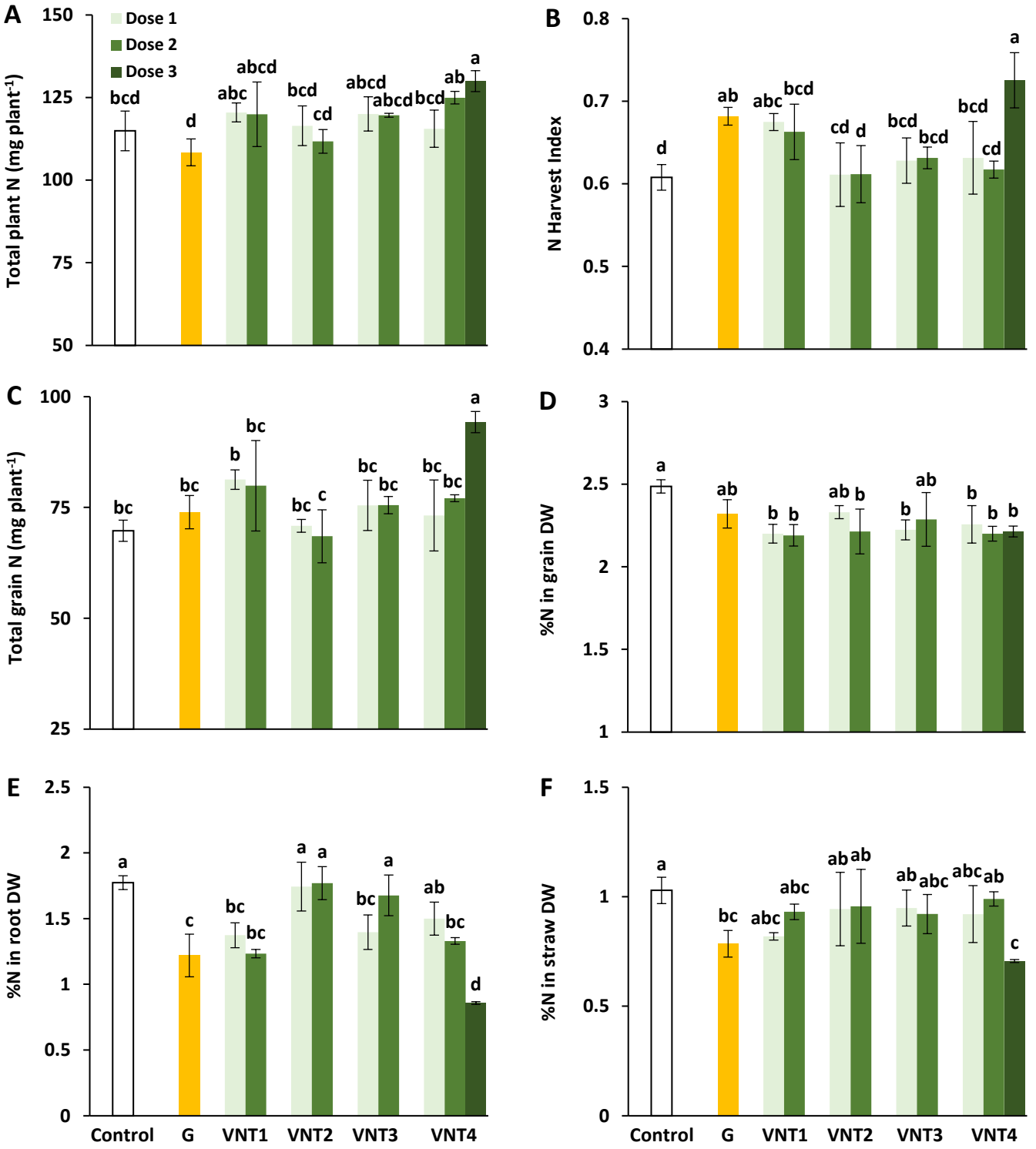


Figure IV.A.2 : Effect of biostimulant formulations mixed with N fertilizer on N uptake and repartition in wheat (*Triticum aestivum* L.). (A) Total plant N, (B) N Harvest Index (NHI), (C) total grain N, and relative N content in the grain (D), roots (E) and straw (F). Plant culture was carried out under semi-hydroponic conditions on a sand/perlite (1/1) substrate (see Materials and methods for details). N was provided at tillering (eq. 50 kg N ha^{-1}), the 2 nodes (eq. 80 kg N ha^{-1}) and heading stages (eq. 20 kg N ha^{-1}). Glutacetine® (G) was mixed with N fertilizer at the heading stage at a dose of 5 L ha^{-1} and applied as a foliar treatment. Four other formulations (VNT1, VNT2, VNT3 and VNT4, see Table IV.A.1 for composition of each) were mixed with N fertilizer at different doses: dose 1 was 83 ml kg N^{-1}, dose 2 was 166 ml kg N^{-1} and dose 3 was the equivalent of 3 x 5 L ha^{-1}. Dose 3 was tested only with VNT4. Plants were harvested at maturity (GS89). Bars indicate means ± SE. Different letters denote significant differences according to Fisher's test ($p < 0.05$; n = 3).

June 2019, systematic applications of plant protection treatments were carried out. Weather conditions (average temperature and total rainfall) were from 11.9 to 12.4°C and from 588 to 611 mm between September 2019 and August 2020 (Supplementary Figure IV.A.1). Previous crops and soil properties were very different at each site (Supplementary Table IV.A.1).

At each site, all plots were fertilized with 30 kg S ha^{-1} at tillering stage (BBCH 29, Lancashire et al., 1991). N fertilization was intended to replicate farmer practice and was calculated using the method (so called “Méthode du Bilan”) described by the French committee COMIFER (Comité français d’étude et de développement de la fertilisation raisonnée, 2000). This method measures the amount of mineral N in soil in February in order to estimate total N soil supply. With the estimation of total plant needs, the method allows to apply N dose close to the crop demand (Supplementary Table IV.A.2). Two different N fertilizers were used: urea 46% and ammonium nitrate urea solution 39% (UAN). N fertilization dose was applied at 152, 210 and 152 kg N ha^{-1} for the site 1, 2 and 3, respectively (Supplementary Table IV.A.2). The first fertilization was applied at tillering (BBCH 21), the second at stem elongation (BBCH 31), and the rest at the last leaf stage (BBCH 39, Supplementary Table IV.A.2). For the last N application, we followed the new N requirement indicators (coefficient "bq") to grow each bread wheat cultivar with a dual objective of optimum yield and grain protein content in line with the market requirements (Cohan et al., 2019). For the biostimulant treatment, 5 L ha^{-1} of VNT4 was mixed with each N application and applied to the soil to achieve 15 L ha^{-1} at each site. Ear number was counted on each plot of the three sites and grains and straws were collected using a combined harvester. All samples were dried (60°C) for 48 h and then ground to a fine powder for agronomic, physicochemical, and N analyses.

After harvesting of winter wheat, 1000 grains weight (TGW, g), grain number per spike and moisture (%) were determined. Yield was then calculated with a standard moisture (15%) and NUE according to Moll et al. (1982) using the following equations: NUE (kg kg^{-1}) = Grain yield (kg ha^{-1}) / N supply (kg ha^{-1}). The relative concentrations of total N in the different tissues were determined and N exported by grains was then calculated.

II.3 Statistical analysis

For individual treatments, the greenhouse experiment (Exp. 1) was performed with three independent biological replicates consisting of one tube (1 replicate = 2 plants per tube).

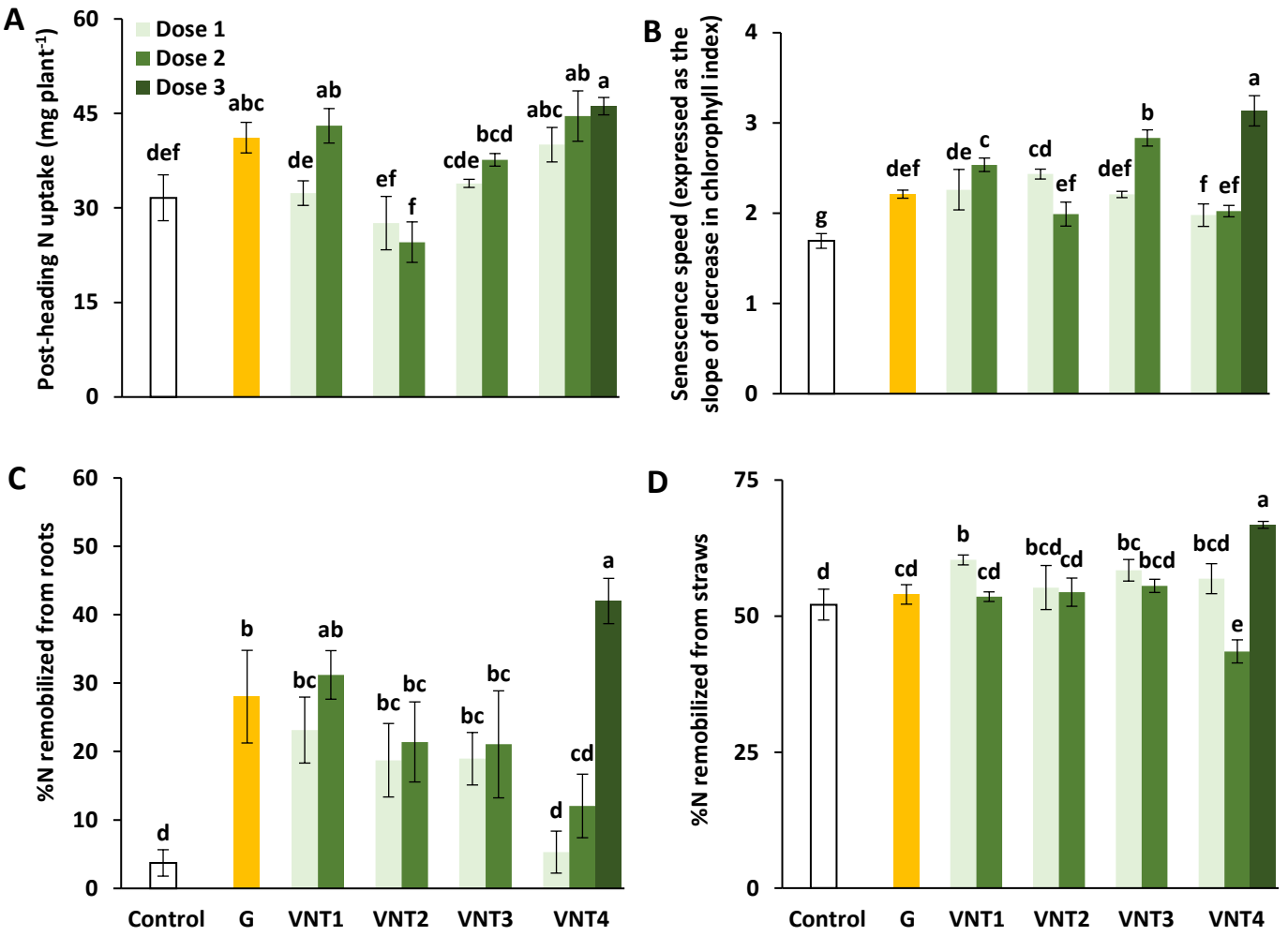


Figure IV.A.3 : Effect of biostimulant formulations mixed with N fertilizer on post-heading N uptake, senescence speed and N remobilization efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). (A) Post-heading N uptake, (B) senescence speed (expressed as the slope of the decrease in the chlorophyll index, see Materials and methods for details), and %N remobilized from roots (C) and straw (D). Plant culture was carried out under semi-hydroponic conditions on a sand/perlite (1/1) substrate (see Materials and methods for details). N was provided at tillering (eq. 50 kg N ha^{-1}), the 2 nodes (eq. 80 kg N ha^{-1}) and heading stages (eq. 20 kg N ha^{-1}). Glutacetine® (G) was mixed with N fertilizer at the heading stage at a dose of 5 L ha^{-1} and applied as a foliar treatment. Four other formulations (VNT1, VNT2, VNT3 and VNT4, see Table IV.A.1 for composition of each) were mixed with N fertilizer at different doses: dose 1 was 83 ml kg N^{-1}, dose 2 was 166 ml kg N^{-1} and dose 3 was the equivalent of 3 x 5 L ha^{-1}. Dose 3 was tested only with VNT4. Plants were harvested at heading stage (GS59) and maturity (GS89). Bars indicate means ± SE. Different letters denote significant differences according to Fisher's test ($p < 0.05$; n = 3).

Data are represented as mean ± standard error (SE) for n = 3. After verifying compliance of normality using Shapiro-Wilk test, analysis of variance (ANOVA) and Fisher's test (R software) were employed to analyse all the data and marked by different letters when significantly different ($p < 0.05$). For the field experiment (Exp. 2), all statistical analyses were performed in R Statistical Software version 3.3. An ANOVA analysis was used to evaluate the effect of site, fertilizer and VNT4 (n = 3). Then, Fisher's test was employed to analyse all the data and marked by different letters when significantly different ($p < 0.05$).

III. Results

III.1 Effect of the formulations under greenhouse conditions (Exp. 1)

In the present study, we tested the effect of N fertilizers containing different formulations of Glutacetine®-based biostimulants on growth, yield, N partitioning and grain quality in winter wheat. The analyses of variance showed strong effects of the formulations, the dose and an interaction between the treatment and the dose depending on the parameters (Supplementary Table IV.A.3). That is why, we performed a Fisher's test to analyse all the data and marked by different letters when significantly different at 5%.

III.1.a Effect of the formulations on biomass, seed yield and grain parameters

To determine the physiological response of plants to the formulations tested (Table IV.A.1), the growth response was evaluated at GS39, GS59 and GS89. There was no consistent change at GS39 and GS59 (Supplementary Figure IV.A.2), but at GS89, VNT1, VNT3 and VNT4 (doses 2 and 3) improved plant DW (6.72 g DW plant^{-1} for control versus 9.16 g DW plant^{-1} for VNT4-D3, Figure IV.A.1A) which is due to a better seed yield for all formulations compared with the control plants (Figure IV.A.1B). Interestingly, seed yield increased significantly with VNT1, VNT3-D1, and VNT4-D2 and especially with VNT4-D3 (+51.7%, Figure IV.A.1B). Grain yields were high (equivalent to 75 and 114 q ha^{-1} for the two extreme treatments), which was probably due to the semi-hydroponic growth conditions. However, root DW was identical irrespective of the formulation (Figure IV.A.1C). In contrast, straw biomass, which correlated with grain yield ($R^2 = 0.65$), ranged from 3.26 g DW plant^{-1} for the control to 4.19 g DW plant^{-1} for VNT4 at dose 3. Indeed, VNT1, VNT2-D1, VNT3 and VNT4 (doses 2 and 3) significantly increased straw DW (Figure IV.A.1D), which contributed to improved plant DW (Figure IV.A.1A).

Table IV.A.3 : Effects of formulations on the composition of macro- and micronutrients in wheat grains. The relative content (expressed as ppm) of each element is determined by ICP-MS.

		K	P	S	Mg	Ca	Na	Fe
Control		4821.3 ± 168.4ab	2382.7 ± 47.8ab	1558.2 ± 56.4a	1294.3 ± 23.8abc	715.0 ± 35.8a	21.0 ± 3.5a	60.4 ± 3.0a
Glutacetine®		4715.1 ± 113.2ab	2346.4 ± 84.0ab	1324.8 ± 14.3bc	1315.5 ± 74.1ab	673.9 ± 18.3ab	11.5 ± 0.7bcd	53.5 ± 2.2ab
VNT1	**Dose 1**	4657.2 ± 190.8ab	2296.0 ± 207.3ab	1220.3 ± 112.4cde	1231.8 ± 68.1bcd	689.0 ± 16.2ab	11.3 ± 1.6bcd	52.5 ± 3.2bc
	Dose 2	4616.6 ± 140.7ab	2257.0 ± 50.0abc	1120.2 ± 23.7de	1210.1 ± 10.0bcd	700.2 ± 43.4ab	12.4 ± 2.5bc	45.8 ± 3.1c
VNT2	**Dose 1**	4925.5 ± 360.7a	2532.2 ± 69.2a	1447.3 ± 90.8ab	1387.9 ± 16.7a	693.3 ± 16.8ab	9.1 ± 3.2cd	55.8 ± 3.1ab
	Dose 2	4371.8 ± 49.4ab	2215.3 ± 82.0bc	1273.3 ± 125.5bcde	1202.3 ± 39.6bcd	691.4 ± 31.4ab	6.6 ± 2.4cd	50.1 ± 2.1bc
VNT3	**Dose 1**	4465.5 ± 30.2ab	2185.3 ± 70.7bc	1244.1 ± 91.7cde	1251.2 ± 15.5bcd	722.4 ± 53.1a	5.5 ± 2.4d	50.9 ± 2.6bc
	Dose 2	4697.4 ± 543.9ab	2228.5 ± 204.8bc	1311.2 ± 134.4bcd	1204.6 ± 86.0bcd	694.4 ± 48.4ab	12.6 ± 4.6bc	52.0 ± 3.1bc
VNT4	**Dose 1**	4304.7 ± 218.1b	2127.8 ± 126.7bc	1192.0 ± 75.0cde	1192.9 ± 37.0cd	650.9 ± 17.4abc	7.3 ± 1.8cd	57.1 ± 5.5ab
	Dose 2	4406.3 ± 81.3ab	2010.9 ± 106.4c	1163.1 ± 60.7cde	1145.4 ± 59.1d	631.5 ± 16.7bc	6.2 ± 1.3d	53.1 ± 2.6abc
	Dose 3	4675.1 ± 198.7ab	2121.7 ± 78.5bc	1099.8 ± 2.3e	1157.5 ± 36.7d	580.7 ± 12.5c	15.6 ± 1.3ab	56.3 ± 2.5ab

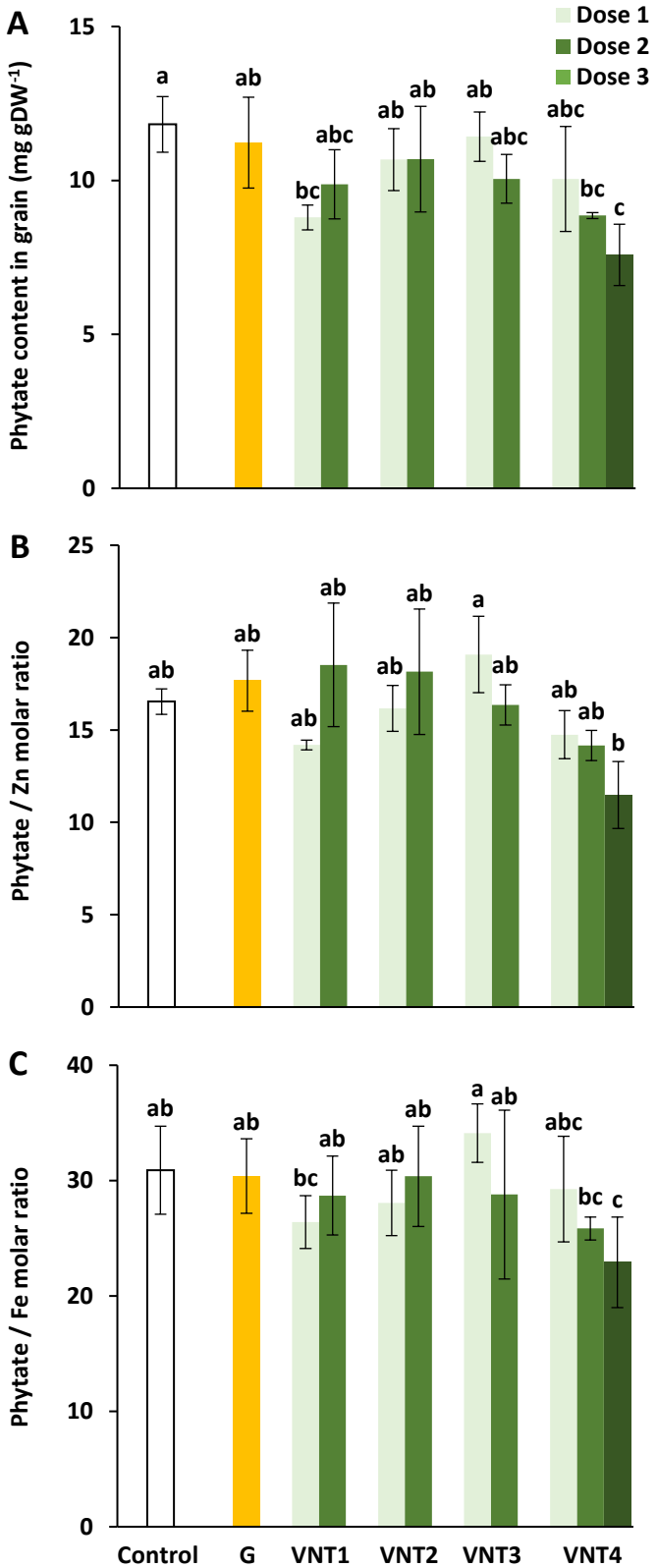
		Zn	Mn	Cu	Mo	B	Cd	Se
Control		38.4 ± 3.2	29.4 ± 1.7ab	7.6 ± 0.11ab	6.1 ± 0.21bcd	2.3 ± 0.11c	0.046 ± 0.0022c	0.0326 ± 0.0071bc
Glutacetine®		36.5 ± 0.9	30.2 ± 0.2ab	7.8 ± 0.36a	6.1 ± 0.35bcd	2.6 ± 0.13ab	0.046 ± 0.0022c	0.0326 ± 0.0034bc
VNT1	**Dose 1**	33.2 ± 1.9	27.0 ± 2.0bc	7.5 ± 0.03abc	5.6 ± 0.13d	2.4 ± 0.09abc	0.045 ± 0.0008c	0.0262 ± 0.0011c
	Dose 2	34.1 ± 0.7	28.3 ± 1.2abc	7.3 ± 0.12bcd	5.7 ± 0.36d	2.4 ± 0.05abc	0.045 ± 0.0016c	0.0277 ± 0.0039c
VNT2	**Dose 1**	37.8 ± 2.1	28.8 ± 0.5abc	7.8 ± 0.28a	7.0 ± 0.16a	2.6 ± 0.07a	0.057 ± 0.0013a	0.0471 ± 0.0050a
	Dose 2	34.8 ± 2.1	29.1 ± 2.0ab	6.8 ± 0.15d	6.5 ± 0.29abc	2.3 ± 0.07c	0.052 ± 0.0011b	0.0435 ± 0.0036ab
VNT3	**Dose 1**	33.3 ± 2.1	27.9 ± 0.5abc	7.3 ± 0.24abc	5.9 ± 0.44cd	2.4 ± 0.15bc	0.052 ± 0.0011b	0.0424 ± 0.0012ab
	Dose 2	37.0 ± 7.8	25.4 ± 0.4c	7.2 ± 0.09bcd	6.7 ± 0.39ab	2.4 ± 0.05bc	0.055 ± 0.0023ab	0.0410 ± 0.0026ab
VNT4	**Dose 1**	34.0 ± 2.8	28.3 ± 2.7abc	7.1 ± 0.23cd	6.3 ± 0.25abcd	2.4 ± 0.11abc	0.047 ± 0.0034c	0.0352 ± 0.0107abc
	Dose 2	34.0 ± 1.7	27.1 ± 0.6bc	7.2 ± 0.11bcd	6.0 ± 0.43bcd	2.3 ± 0.06bc	0.052 ± 0.0005b	0.0453 ± 0.0041a
	Dose 3	33.1 ± 2.0	31.3 ± 1.2a	7.2 ± 0.15bcd	6.1 ± 0.42bcd	2.2 ± 0.05c	0.054 ± 0.0016ab	0.0456 ± 0.0045ab

Values indicate means ± SE. Different letters denote significant differences according to Fisher's test ($p < 0.05$; n = 3).

The improvement in seed yield was related to the increase in grain number per spike. Indeed, except for VNT2-D2 and VNT4-D1, the number of grains per spike was significantly higher for all formulations with a maximum observed for VNT4-D3 plants (46 vs 30.2 grains per spike in the control group) (Figure IV.A.1E). Very interestingly, fruiting efficiency was also improved in response to all formulations, excluding VNT2 at the first dose (Figure IV.A.1F), suggesting that these formulations could increase wheat fertility during the flowering period. In the present study, the spike number per plant did not show consistent change (Table IV.A.2). Nevertheless, due to the better grain number per spike, the grain number per plant was increased by all formulations (except VNT2-D2, Table IV.A.2). Compared with the control, Glutacetine®, VNT2-D1, and VNT3 reduced the TGW, whereas VNT1-D2, VNT2-D2, and VNT4 (doses 1 and 2) improved the specific weight (Table IV.A.2). The harvest index lies between 0.42 and 0.47, which is close to values observed under field conditions (Barraclough et al., 2010). A significant increase in the harvest index was also observed in response to VNT1 (doses 1 and 2) and VNT4-D3 (+9.8, +11.7 and +11.2%, respectively, Table IV.A.2).

III.1.b Effect of the formulations on N status and N partitioning at the whole plant level

VNT4-D3 is the only treatment that significantly increased total plant N compared with the control (+15 mg N plant^{-1}, Figure IV.A.2A). Moreover, a higher NHI was observed for Glutacetine®, VNT1-D1, and VNT4-D3 (+12.2, +11 and +19.3% compared with the control group, Figure IV.A.2B) and a better NUE with VNT4-D3 (Table IV.A.2). Remarkably, total grain N was increased only by VNT4-D3 compared with the control plants (+24.5 mg N plant^{-1}, Figure IV.A.2C). As expected, higher grain yields of VNT1, VNT2-D2, VNT3-D1, and VNT4 were also associated with the decline in grain N concentrations (Figure IV.A.2D). Regarding the influence of the formulations on N concentration and partitioning in wheat at maturity, a significant reduction in root N concentration was reported for Glutacetine®, VNT1 (doses 1 and 2), VNT3-D1, and VNT4 (doses 2 and 3) (-31.2, -22.6, -30.4, -25, -21.2, and -51.7%, respectively, compared with the control, Figure IV.A.2E). Similar results were recorded for N concentration in straws for Glutacetine® and VNT4-D3 alone (1.03% for the control plants versus 0.78% for Glutacetine® and 0.71% DW for VNT4-D3, Figure IV.A.2F). In comparison with the control plants, these results suggest that the formulations result in better N remobilization from roots and straw toward the grain.



<u>Figure IV.A.4</u> : Effect of biostimulant formulations mixed with N fertilizer on phytate, zinc and iron content in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain. (A) Phytate content in grain, (B) the phytate / Zn molar ratio and (C) the phytate / Fe molar ratio. Plant culture was carried out under semi-hydroponic conditions on a sand/perlite (1/1) substrate (see Materials and methods for details). N was provided at tillering (eq. 50 kg N ha^{-1}), the 2 nodes (eq. 80 kg N ha^{-1}) and heading stages (eq. 20 kg N ha^{-1}). Glutacetine® (G) was mixed with N fertilizer at the heading stage at a dose of 5 L ha^{-1} and applied as a foliar treatment. Four other formulations (VNT1, VNT2, VNT3 and VNT4, see Table IV.A.1 for composition of each) were mixed with N fertilizer at different doses: dose 1 was 83 ml kg N^{-1}, dose 2 was 166 ml kg N^{-1} and dose 3 was the equivalent of 3 x 5 L ha^{-1}. Dose 3 was tested only with VNT4. Plants were harvested at maturity (GS89). Bars indicate means ± SE. Different letters denote significant differences according to Fisher's test ($p < 0.05$; n = 3).

III.1.c Impact of the formulations on N uptake and N remobilization between heading and maturity

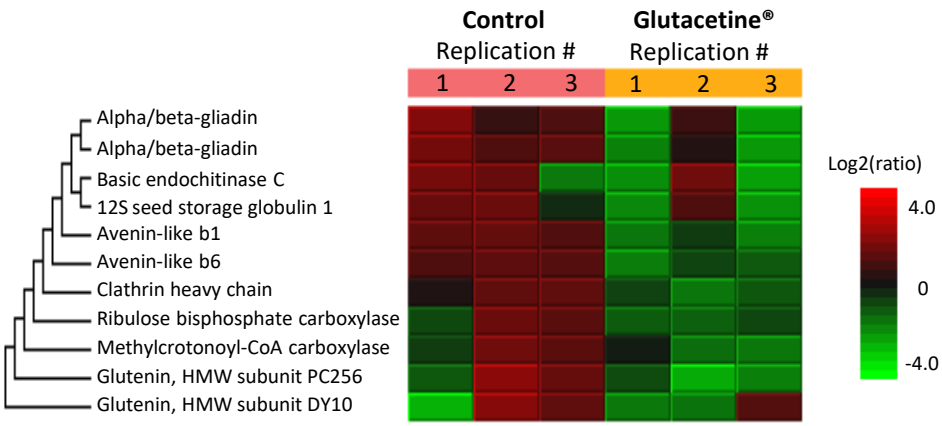
The N amounts observed in the grain at heading and maturity (final harvest) are used to calculate post-heading N uptake and N remobilization efficiency. Total grain N (Figure IV.A.2C) was higher than total post-heading N uptake (calculated as the difference between total plant N at maturity and total plant N at heading, Figure IV.A.3A), indicating that (i) N uptake after heading was strongly induced by Glutacetine®, VNT1-D2 and VNT4 (Figure IV.A.3A) and (ii) there was a net rate of remobilization of N from vegetative parts toward the grain (Figure IV.A.3C and D). Indeed, compared with the control plants, we measured higher uptakes of 9.6 (Glutacetine®), 11.4 (VNT1-D2), 8.4 (VNT4-D1), 13 (VNT4-D2) and 14.5 mg N $plant^{-1}$ (VNT4-D3).

In addition, the senescence speed (estimated as the slope of decline in chlorophyll index between post-flowering and maturity) was measured for each treatment using an optical sensor system (see Materials and methods for more details). Irrespective of the formulation, the slope of the decrease in the chlorophyll index between post-flowering and maturity significantly increased (Figure IV.A.3B). To better understand the effect of the formulations tested, we calculated the rate of N remobilized from roots and straw between the heading and maturity stages. Interestingly, all formulations (except VNT4-D1 and D2) increased the rate of N remobilization from roots (Figure IV.A.3C) with a major effect from VNT4-D3 (+38.3% compared with the control group). VNT1-D1, VNT3-D1 and VNT4-D3 also improved remobilization efficiency in the straw (Figure IV.A.3D). Together, these results strongly suggest that VNT4 at dose 3 increased N uptake after heading and accelerated senescence, which improved N remobilization from roots and straw in particular, leading to an increase in yield and NHI.

III.1.d Impact of biostimulant formulations on wheat grain quality

III.1.d.a Changes in the grain ionome

ICP-MS analysis of the grain macronutrient composition revealed that no consistent change was observed for K, and only VNT4-D2 reduced the %P concentration in the grain (-18.5%, Table IV.A.3). VNT4 (doses 2 and 3) also decreased the Mg and Ca concentrations (Table IV.A.3). Furthermore, S was significantly lower relative to the control group with all formulations except VNT2-D1 (Table IV.A.3). Regarding Na concentrations, only VNT4-D3 maintained the level of control plants while all other formulations significantly decreased %Na



<u>Figure IV.A.5</u> : Effect of the Glutacetine® formulation mixed with N fertilizer on the wheat (*Triticum aestivum* L.) grain proteome. Plant culture was carried out under semi-hydroponic conditions on a sand/perlite (1/1) substrate (see Materials and methods for details). N was provided at tillering (eq. 50 kg N ha^{-1}), the 2 nodes (eq. 80 kg N ha^{-1}) and heading stages (eq. 20 kg N ha^{-1}). Glutacetine® was mixed with N fertilizer at the heading stage at a dose of 5 L ha^{-1} and applied as a foliar treatment. Seeds were harvested at maturity (GS89). A 1.5-fold increase in relative abundance and a Peaks Q threshold ≥ 20 were used to determine enriched peptides/proteins. Only proteins with significant differences in abundance between both treatments are presented.

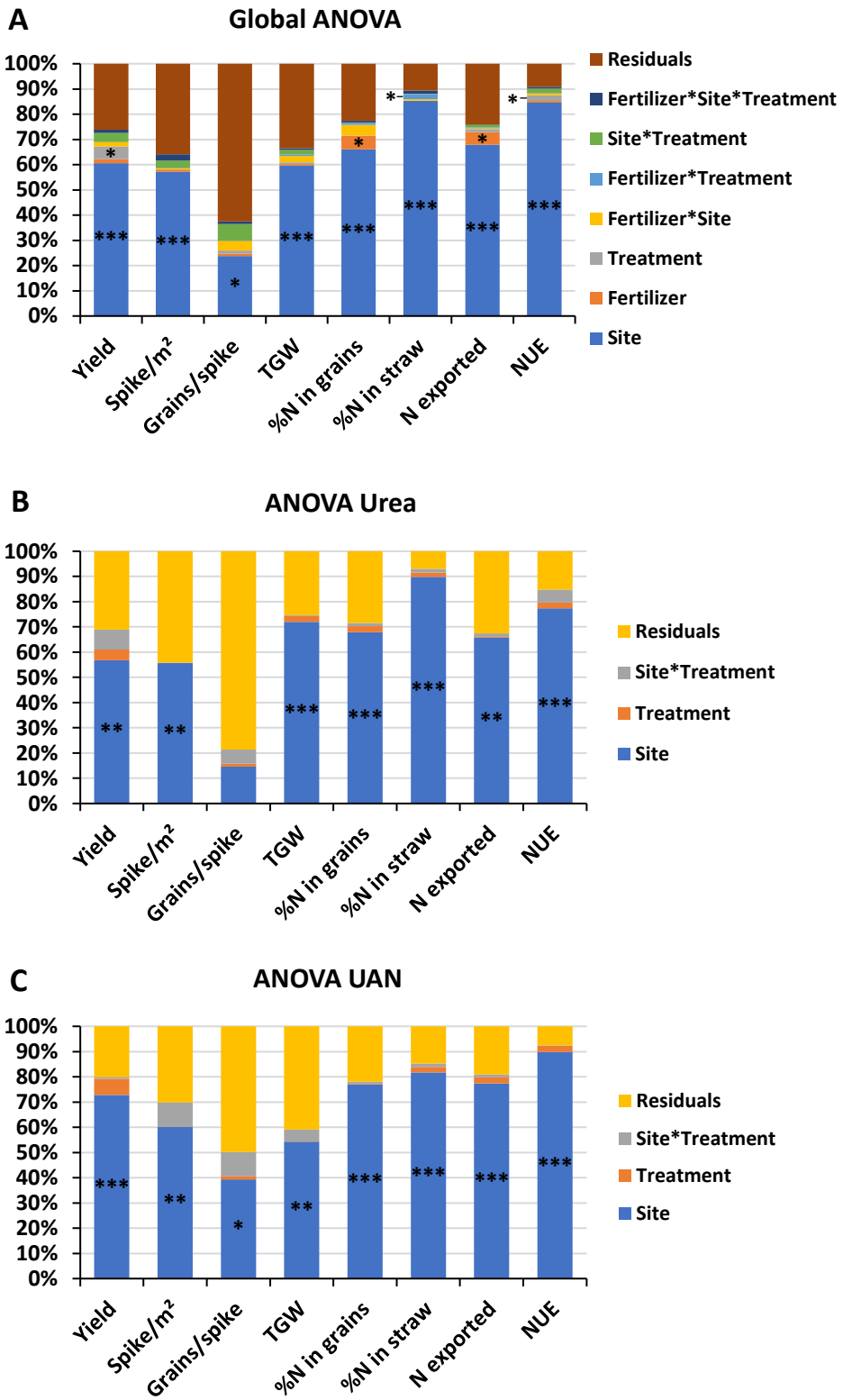
(Table IV.A.3). Fe was also reduced for all formulations (from 3.3 to 14.6 ppm), but the decline was only significant for VNT1, VNT2-D2, and VNT3 (Table IV.A.3). Among the micronutrients, there was no consistent change in Zn concentration in the grain, a crucial nutrient for human health. Compared with the control grain, VNT3-D2 decreased the Mn concentration (-13.4%, Table IV.A.3), whereas VNT2-D2 and VNT4-D1 reduced the Cu concentration (-7.3 and -6.8%, respectively, Table IV.A.3). In contrast, Mo and B contents were both improved by VNT2-D1 (+0.9 ppm and +0.3 ppm, respectively, Table IV.A.3) and Glutacetine® also increased B concentrations in the grain (+0.3 ppm, Table IV.A.3). Finally, Se was also enhanced by VNT2-D1 and VNT4-D2, and VNT2, VNT3, and VNT4 (only at D2 and D3) increased Cd concentrations in the grain (Table IV.A.3).

III.1.d.b Phytate contents

As previously observed for P concentrations (Table IV.A.3), application of VNT1-D1 and VNT4 (doses 2 and 3) reduced the phytate content (Figure IV.A.4A), which has antinutritional properties. The response of wheat plants to the formulations was then investigated with respect to the bioavailability of elements. We thus calculated the phytate/Zn and phytate/Fe molar ratios, which are good indicators of Zn/Fe availability in wheat grain for humans (Brown et al., 2004; Ciccolini et al., 2017). There was no consistent change in Zn bioavailability compared with the control (Figure IV.A.4B). However, a significant reduction in the phytate/Fe molar ratio was observed for VNT4-D3 compared with the control group (Figure IV.A.4C), indicating that VNT4 at the third dose was able to augment the iron bioavailability in wheat flour.

III.1.d.c Grain proteome

The response of wheat plants to the formulations was further investigated in terms of quantitative proteomic changes in the flour. Proteomic analysis was focused on the Glutacetine® treatment because it was the only foliar treatment at heading that might have significantly affected the grain quality. Almost 1900 proteins were detected (1835 for control grain and 1842 for grain under Glutacetine® treatment), leading to the identification of 1850 proteins in total. Even though the protein content was not significantly different compared with the control (Table IV.A.2), proteomics revealed strong differences between these treatments for 11 proteins (Figure IV.A.5). Indeed, the amount of seed storage proteins was significantly lower under Glutacetine® than under the control plants (Figure IV.A.5). Two α/β gliadins, which are strongly linked to celiac disease (Shewry and Tatham, 2016; Sollid et al.,



<u>Figure IV.A.6</u> : Schematic representation of ANOVA of Yield (t ha^{-1}), Spike number per square meter, grain number per spike, thousand grain weight (TGW), N content in grains (%), N content in straw (%), N exported by grains (kg ha^{-1}) and NUE (kg kg^{-1}). (A) Global ANOVA using data obtained in the 3 sites and with the 2 fertilizers, (B) ANOVA Urea using data obtained in the 3 sites with urea fertilization and (C) ANOVA UAN using data obtained in the 3 sites with UAN fertilization. *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$ and * : $p < 0.05$.

2012), were greatly reduced by Glutacetine® treatment (Figure IV.A.5). Gliadins include members with a large repetitive domain and a conserved set of cysteine residues (α/β- and γ-gliadins), members with a repetitive domain but no cysteine (ω-gliadins), and members with low molecular weight gliadins (LMWGs), also known as avenin-like proteins (Zhang et al., 2018). The avenin-like proteins (b1 and b6), which were reduced in the Glutacetine® treatment (Figure IV.A.5), are also rich in cysteine (18 or 19 residues), which form intermolecular disulfide bonds and participate in glutenin polymerization (Ma et al., 2013; Wang et al., 2019). These proteins are known to have impact on dough proprieties (Chen et al., 2016) and antifungal activities (Wang et al., 2019). Some of these changes could be related to the reduction in S content in grain with Glutacetine® treatment compared with the control group (Table IV.A.3) and changed the N-to-S ratio (Supplementary Figure IV.A.3, Bonnot et al., 2017; Dai et al., 2015). Foliar application of Glutacetine® also decreased other storage proteins. Regarding globulin storage proteins, Gell et al. (2017) have recently characterized this family of storage proteins in relation to celiac disease. Our results showed that Glutacetine® led to a lower accumulation of 12S seed storage globulin 1 (-55.9% compared with the control, Supplementary Table IV.A.4). It is also well documented that the level of fertilizer inputs has a considerable effect on glutenin composition (Tóth et al., 2019; Yue et al., 2007). In our study, two glutenin HMW subunits (PC256 and DY10) were reduced under Glutacetine® treatment; this result is related to the N amount per grain as the amount of glutenin varied in direct proportion (Plessis et al., 2013). A reduction in metabolic proteins (endochitinase, clathrin heavy chain, ribulose bisphosphate carboxylase and methylcrotonyl-CoA carboxylase) was also observed in response to Glutacetine®. Chitinase activity and clathrin in wheat grain might play roles in responses to infections in plant (Ekanayake et al., 2019; Guo et al., 2012) and methylcrotonyl-CoA carboxylase is an enzyme required for leucine catabolism and may be important during seed development and germination (Ding et al., 2012). These proteomics results highlighted the significant impact of Glutacetine® on wheat grain quality.

III.2 Impact of VNT4 under contrasting field conditions (Exp. 2)

To validate the effect of VNT4, three field trials were carried out at contrasting sites in Normandy (France, Supplementary Table IV.A.1). Global ANOVA revealed a strong site effect for all parameters analysed (Figure IV.A.6A). This analyse also indicated an effect of fertilizer

Table IV.A.4 : Effects of VNT4 on yield, spike number per square meter, TGW, N content in grains and straw, N exported by grains and NUE under contrasting field conditions.

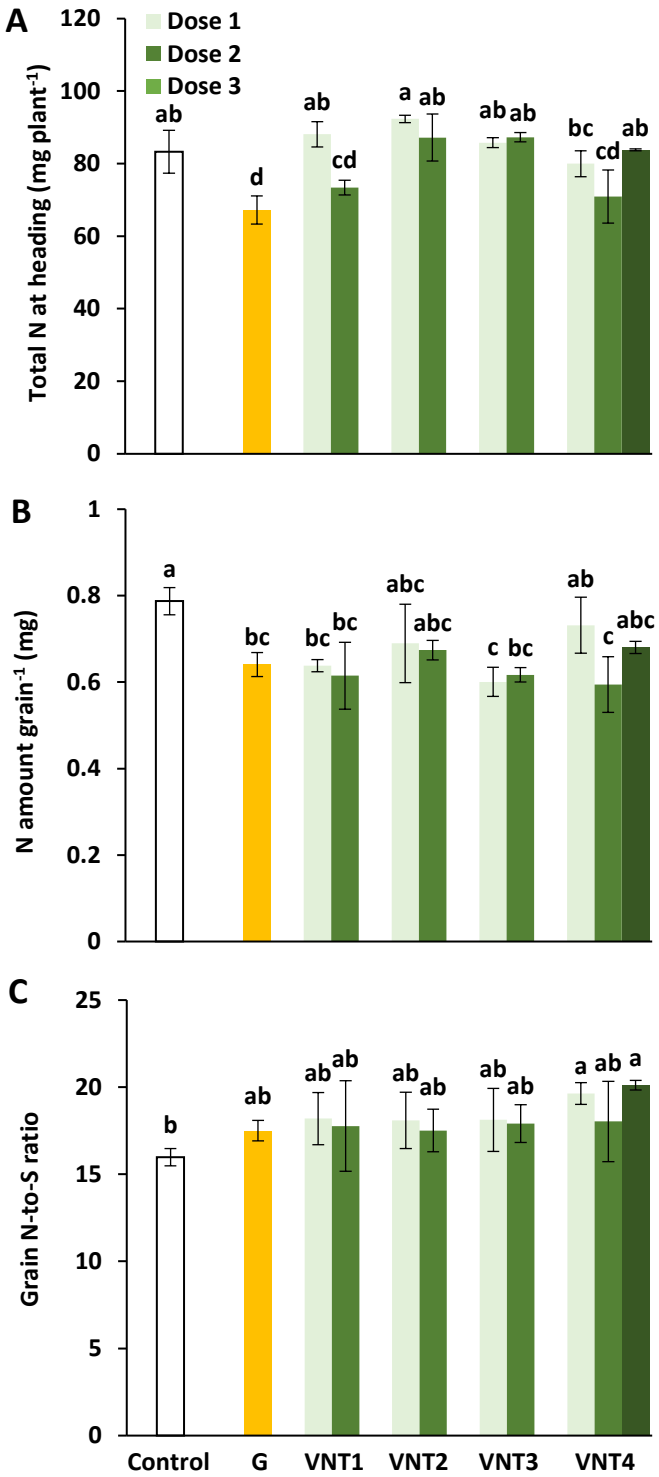
			Yield (t ha^{-1})	Spike m^{-2}	Grains spike^{-1}	TGW (g)	%N in grains	%N in straw	N exported (kg ha^{-1})	NUE (kg kg^{-1})
Site 1	Urea	Control	12.05 ± 0.16bc	576.0 ± 18.5ab	42.87 ± 1.23abc	54.13 ± 0.52a	1.88 ± 0.02de	0.70 ± 0.00ab	226.9 ± 2.95bc	79.3 ± 1.03ab
		VNT4	11.64 ± 0.27bcd	576.0 ± 27.7ab	40.96 ± 1.94abc	54.79 ± 0.78a	1.88 ± 0.02de	0.71 ± 0.02ab	219.3 ± 5.86c	76.6 ± 1.78ab
	UAN	Control	11.84 ± 0.14bc	541.3 ± 8.2abcd	45.28 ± 1.36ab	53.40 ± 0.57ab	1.70 ± 0.07e	0.64 ± 0.02b	201.5 ± 9.14c	77.9 ± 0.92ab
		VNT4	12.08 ± 0.12bc	588.0 ± 18.5a	44.36 ± 1.82abc	51.56 ± 1.24abc	1.68 ± 0.04e	0.66 ± 0.03ab	202.8 ± 7.44c	79.5 ± 0.82a
Site 2	Urea	Control	12.32 ± 0.26ab	600.0 ± 23.1a	39.30 ± 1.62bc	53.85 ± 0.95a	2.25 ± 0.06a	0.76 ± 0.04a	277.8 ± 13.21a	58.7 ± 1.25fg
		VNT4	13.25 ± 0.67a	598.7 ± 23.6a	42.95 ± 3.78abc	54.71 ± 1.04a	2.17 ± 0.06abc	0.67 ± 0.01ab	288.2 ± 20.07a	63.1 ± 3.18ef
	UAN	Control	11.95 ± 0.31bc	625.3 ± 14.9a	36.46 ± 0.97c	54.59 ± 1.65a	2.21 ± 0.01ab	0.66 ± 0.03ab	264.7 ± 8.26ab	56.9 ± 1.46g
		VNT4	12.52 ± 0.19ab	566.7 ± 19.5abc	42.23 ± 1.74abc	54.82 ± 0.73a	2.24 ± 0.11a	0.76 ± 0.06a	280.2 ± 11.49a	59.6 ± 0.88fg
Site 3	Urea	Control	10.37 ± 0.08e	486.0 ± 16.2cde	44.70 ± 1.40abc	47.94 ± 0.21c	2.08 ± 0.06abcd	0.39 ± 0.01c	215.9 ± 4.14c	68.2 ± 0.55cde
		VNT4	11.20 ± 0.07cde	494.7 ± 12.6bcde	46.08 ± 2.14ab	49.35 ± 1.09c	2.02 ±0.03bcd	0.33 ± 0.03c	225.9 ± 3.82c	73.7 ± 0.48bc
	UAN	Control	10.18 ± 0.26e	454.0 ± 37.7e	47.82 ± 3.42a	47.84 ± 0.26c	1.88 ± 0.04de	0.37 ± 0.01c	191.9 ± 9.19c	66.9 ± 1.73de
		VNT4	10.75 ± 0.20de	475.3 ± 10.3de	46.58 ± 0.48ab	49.56 ± 1.29bc	1.97 ± 0.05cd	0.38 ± 0.02c	211.1 ± 2.53c	70.7 ± 1.29cd

Values indicate means ± SE. Different letters denote significant differences according to Fisher's test ($p < 0.05$; n = 3).

type on N content in grain and on N exported by grains (Figure IV.A.6A). Interestingly, VNT4 influenced yield and NUE (Figure IV.A.6A). Indeed, VNT4 treatment improved these parameters irrespective of the site and the fertilizer used except with urea at site 1 (Table IV.A.4). There is also a significant interaction between fertilizer used and treatment on N content in straw (Figure IV.A.6A). In fact, mixed with urea, VNT4 tended to decrease N concentration in straw, whereas it tended to increase it when mixed with UAN (Table IV.A.4). Moreover, the ANOVA of urea fertilization showed only a site effect for all parameter except grain number per spike (Figure IV.A.6B). However, the ANOVA of UAN indicated a site effect on grain number per spike (Figure IV.A.6C). In addition, there is a slight effect of VNT4 on yield and NUE when mixed with UAN (p = 0.073 and p = 0.075, respectively, Figure IV.A.6C). Finally, on field trial 1 (site 1), N content was influenced by fertilizer type, whereas no consistent change was observed at site 2 (Supplementary Figure IV.A.4). Interestingly, VNT4 improved yield and NUE at site 3 with a slight increase of N exported by grains (p = 0.083), whereas fertilizer type only influenced N exported by grains (Supplementary Figure IV.A.4). Regarding yield, VNT4 mixed with urea increased it at sites 2 and 3 but decreased it at site 1, whereas when VNT4 is mixed with UAN, yield increased irrespective of the site (from +246 to 574 kg ha^{-1}, with a mean of 463 kg ha^{-1}, Table IV.A.4). This improvement is due either to the increase of spike number per square meter (sites 1 and 3) or to the better grain number per spike (site 2, Table IV.A.4). On N partitioning, there was no consistent change involved by VNT4 in straw and grain. But, except at site 1 with urea, VNT4 increased N exported by grains and NUE (Table IV.A.4). Indeed, when mixed with UAN, VNT4 increased N exported by 12 kgN ha^{-1} and NUE by 4%. These results under contrasting field conditions confirmed our previous results under controlled conditions on agronomic parameters especially when VNT4 is mixed with UAN.

IV. Discussion

The goals of this study were to provide a detailed analysis of the effects of N fertilizers containing diverse formulations of Glutacetine®-based biostimulants on physiological traits, N uptake and partitioning, agronomic traits, and different criteria related to wheat grain quality. VNT formulations were mixed with N fertilizers and applied during each N supply, whereas Glutacetine® was mixed with N fertilizers and sprayed during the last supply alone. Clearly, the present work does not provide any functional dissection of N metabolism in the plants but aims to highlight the impacts of the formulations during senescence and on N use efficiency



<u>Supplementary Figure IV.A.3</u> : Effect of biostimulant formulations mixed with N fertilizer on total N at heading, the N amount per grain and the grain N-to-S ratio in wheat (*Triticum aestivum* L.). (A) Total N at heading, (B) the N amount per grain, and (C) the grain N-to-S ratio. Plant culture was carried out under semi-hydroponic conditions on a sand/perlite (1/1) substrate (see Materials and methods for details). N was provided at tillering (eq. 50 kg N ha^{-1}), 2 nodes (eq. 80 kg N ha^{-1}) and heading (eq. 20 kg N ha^{-1}) stages. Glutacetine® (G) was mixed with N fertilizer at the heading stage at a dose of 5 L ha^{-1} and applied as a foliar treatment. Four other formulations (VNT1, VNT2, VNT3 and VNT4, see Table IV.A.1 for composition of each) were mixed with N fertilizer at different doses: dose 1 was 83 ml kg N^{-1}, dose 2 was 166 ml kg N^{-1} and dose 3 was the equivalent of 3 x 5 L ha^{-1}. Dose 3 was tested only with VNT4. Plants were harvested at heading stage (GS59) and maturity (GS89). Bars indicate means ± SE. Different letters denote significant differences according to Fisher's test (p < 0.05; n = 3).

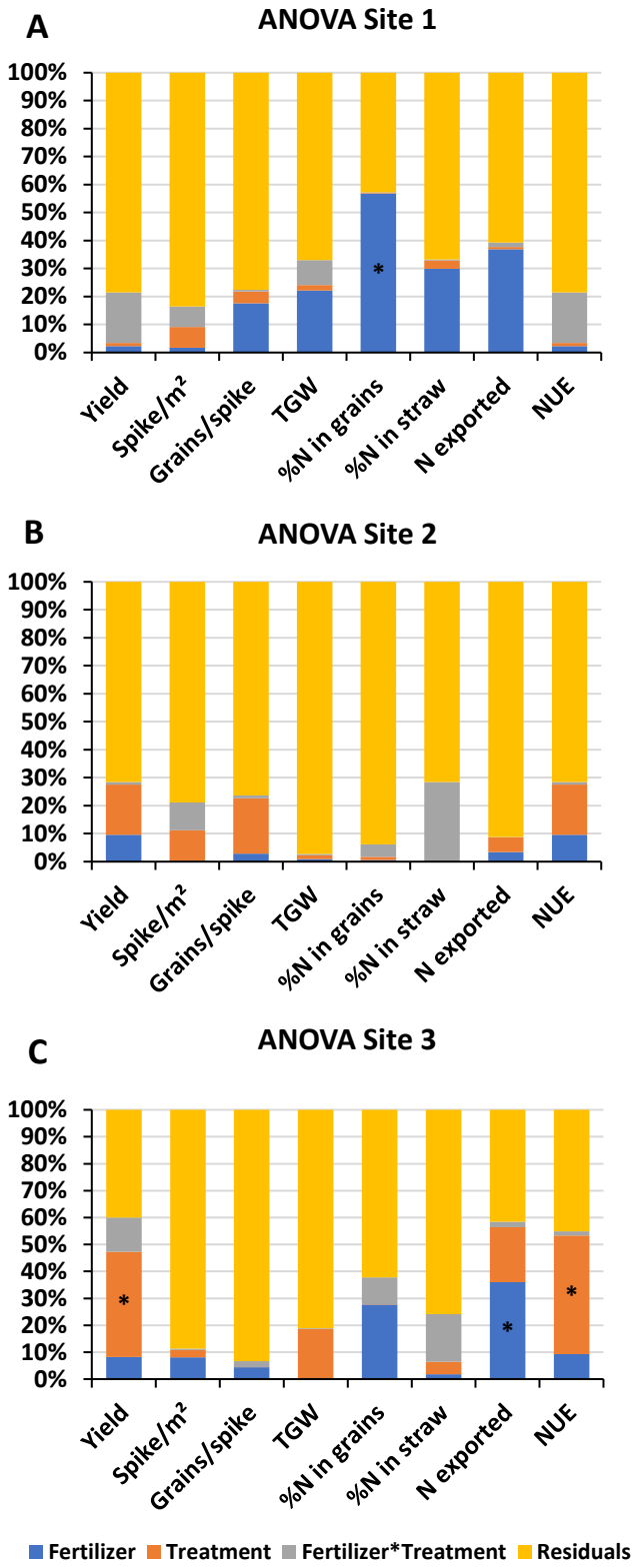
in wheat plants grown under realistic conditions in terms of plant size, canopy structure, and grain sink strength.

IV.1 Formulations enhanced straw biomass, increased grain yields, and impacted the components of grain yield

Winter wheat cv. Récital achieves an average grain yield of 2.84 g plant^{-1} under field conditions (equivalent at 711 g m^{-2}, Bogard et al., 2010). Under semi-hydroponic conditions, Récital attains 2.8-7.8 g plant^{-1}, depending on the N conditions (Taulemesse et al., 2015). In the present work, the grain yield of Récital was between 2.8 to 4.3 g plant^{-1} (Figure IV.A.1B), indicating that our experimental design led to grain yields that were very close to those obtained in field trials. Values obtained for TGW and grain density were low compared with field trials, which have been reported above 40 g for TGW (Popko et al., 2018) and above 75 kg hl^{-1} in terms of density (Manley et al., 2009). However, Baillot et al. (2018) showed a reduction in the TGW between field and greenhouse conditions. These trends are in accordance with our values (27-33 g).

In our study, several biostimulants (VNT1, VNT3-D1, VNT4-D2, and D3) resulted in a significant increase in grain yield (up to +51.7% for VNT4-D3 compared with control, Figure IV.A.1B). This improvement is due in particular to the increase in the grain number per spike (Figure IV.A.1E) and the fruiting efficiency (Figure IV.A.1D). In contrast, Glutacetine®-based formulations did not show consistent changes in tiller number and spike number per plant (Table IV.A.1). In accordance with our findings, Popko et al. (2018) also observed a positive effect of amino acid-based biostimulants used in foliar treatments on plant growth, grain yield and ear number per square metre in winter wheat. It is also well documented that other biostimulants, such as arbuscular mycorrhizal fungi in association with crops, have positive impacts on vegetative and grain DW (Bücking and Kafle, 2015; Criado et al., 2015; Verzeaux et al., 2017). When used in soil or in foliar treatments, Subbarao et al. (2015) showed that protein hydrolysate enhanced plant growth (roots and shoots) and seed yield in rice, finger millet, radish, and cowpea. Moreover, soil application was more effective than foliar application, which is in accordance with our findings. Similar results were obtained by Nguyen et al. (2019), who tested the effect of *Bacillus* strains on wheat under contrasting N supplies.

Our results also showed that straw biomass at the maturity stage correlated with grain yield (R^2 = 0.65). This correlation suggests that biostimulant treatments leading to high above-

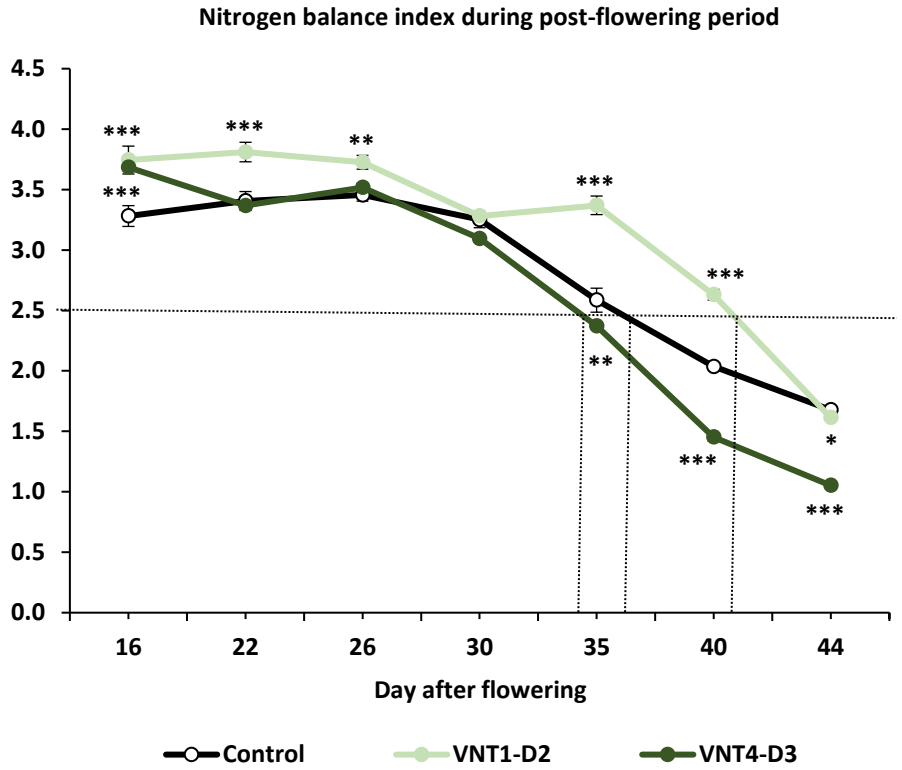


<u>Supplementary Figure IV.A.4</u> : Schematic representation of ANOVA of yield (t ha^{-1}), spike number per m^{-2}, grain number per spike, thousand grain weight (TGW), N content in grain (%), N content in straw (%), N exported by grains (kg ha^{-1}) and NUE (kg kg^{-1}). (A) ANOVA Site 1 using data with the 2 fertilizers, (B) ANOVA Site 2 using data with the 2 fertilizers and (C) ANOVA Site 3 using with the 2 fertilizers. *** : P < 0.001, ** P < 0.01 and * : P < 0.05.

ground biomass produced higher grain yield, as previously reported when N nutrition is not limiting (Gaju et al., 2016). This is a consequence of physiological mechanisms that contribute to high straw biomass production and that may result in enhanced N storage capacity in the plant. In our findings, when VNT4 was applied at 5 L ha^{-1} with each N supply (D3), the capacity of N storage was significantly increased but only after heading. Indeed, VNT4-D3 did not change the N amount at heading compared with control (Supplementary Figure IV.A.2), but the N amount was improved during the post-heading period (Figure IV.A.2A). This is in agreement with data from the literature that describe biostimulants as acting by increasing plant mineral uptake and by improving nutrient use efficiency (Calvo et al., 2014; du Jardin, 2015). In fact, different kinds of biostimulants (protein hydrolysate, plant extracts, *Trichoderma*) on various plant species, such as tomato (*Solanum lycopersicum* L.), dwarf pea (*Pisum sativum* L.), corn (*Zea mays* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.) and rocket (*Eruca sativa* Mill.), are able to improve NUE (Colla et al., 2014; Di Mola et al., 2019; Fiorentino et al., 2018; Sestili et al., 2018).

IV.2 Formulations induced differences in post-heading N uptake and N remobilization

As previously reported in durum wheat (Pichereaux et al., 2019), we observed deviations from the grain N concentration to grain yield negative correlation for VNT1-D2, VNT2 (doses 1 and 2), and VNT4 (doses 1 and 3). Bogard et al. (2010) correlated this deviation to post-anthesis N uptake in winter wheat, which explains the results of VNT1-D2 and VNT4 (Figure IV.A.3A). Root activity was maintained under these treatments during the grain-filling period (Figure IV.A.3A). Therefore, VNT1-D2 and VNT4-D3 probably maintain post-flowering N uptake during grain development, and this then guaranteed that the protein content was adequate for high grain yield. Indeed, Taulemesse et al. (2016) demonstrated that the grain N concentration at maturity and N uptake from flowering to GS65 + 250 degree days were correlated (R^2 = 0.8). The post-heading N uptake of VNT4 at dose 2 allowed the wheat plants to increase yield alone because their protein content correlated with this seed yield (R^2 = 0.96). However, it has also been observed that primary N assimilation decreases with senescence, whereas N recycling and remobilization enzymes are stimulated (Masclaux-Daubresse et al., 2010). In our study, the formulations seemed to maintain N uptake and assimilation during the senescence process.



<u>Supplementary Figure IV.A.5</u> : Effect of biostimulant formulations mixed with N fertilizer on N balance index during post-flowering period in wheat (*Triticum aestivum* L.). N balance index of vegetative parts were measured during post-flowering period with an optical sensor system (fluorimeter Multiplex®, Force A, Orsay, France). A value below 2.5 indicates that the plant is in senescence (general yellowing of leaves). Plant culture was carried out under semi-hydroponic conditions on a sand/perlite (1/1) substrate (see Materials and methods for details). N was provided at tillering (eq. 50 kg N ha^{-1}), 2 nodes (eq. 80 kg N ha^{-1}) and heading (eq. 20 kg N ha^{-1}) stages. VNT1 and VNT4 (see Table IV.A.1 for composition of each formulation) were mixed with N fertilizer at different doses: dose 2 was 166 ml kg N^{-1} and dose 3 was the equivalent of 3 x 5 L ha^{-1}. Dose 3 was tested only with VNT4. Bars indicate means ± SE. Different letters denote significant differences according to Student's test (p < 0.05*, 0.01**, 0.001***; n = 4).

Three main hypotheses can be proposed to explain the physiological mechanisms underlying the variability in the formulation responses during post-heading N uptake for a given total N at heading. The first postulate is related to phenotypic differences in accessing soil N. In our study, VNT4-D2 had a significantly higher root DW than VNT1-D2, which could partially explain the different behaviours between these two treatments. Indeed, VNT4 at the second dose was associated with a slow senescence speed compared with VNT1-D2 (Figure IV.A.3B) but had a better rate of N remobilization from roots (Figure IV.A.3C) and straws (Figure IV.A.3D).

The second hypothesis is related to the interactions of biostimulants on the regulation of N uptake by the plant N status. It is well documented that plant N status regulates N influx (Barneix, 2007), and in particular regulates the transcription of nitrate transporters with the phloem amino acid concentration (Glass, 2002). Amino acids contained in our biostimulant formulations may have interfered with and altered the internal plant signaling associated with plant N status, and this might explain the differences in post-heading N uptake and remobilization.

The third hypothesis to explain the variability in the responses of post-heading N uptake may be energy related. Delaying senescence is able to prolong photosynthetic activity (Havé et al., 2017) and therefore maintain the delivery of carbon to the roots in order to maintain a higher capacity to take up N from the substrate during the post-heading period. Regarding our N index data, a value below 2.5 indicates that the plant is in senescence (with a general yellowing of leaves). Therefore, senescence began two days before the control group following the VNT4 third dose, whereas senescence was delayed for four days under VNT1-D2 (Supplementary Figure IV.A.5). Delaying leaf senescence is also associated with increased seed yield or grain protein content, depending on the environments considered (Bogard et al., 2011). This differential effect on grain yield and grain protein concentration of delaying leaf senescence is related to N availability during the post-anthesis period. In our findings, only VNT1-D2 and VNT4-D2 were associated with delayed senescence and increased N uptake after heading.

These three hypotheses are not mutually exclusive; data are also currently lacking in terms of rejecting one or the other. It is possible that the physiological differences observed

for post-anthesis N uptake at a given total N at anthesis are caused by the three proposed processes and their potential interactions.

Furthermore, our study showed that the formulations strongly increased remobilization efficiency from roots and/or the straw toward the grain. This could be due to a higher proteolysis and autophagic activity that improved N remobilization efficiency and grain filling (Su et al., 2020). Regarding remobilization, plant extracts might reprogram N distribution and remobilize it from amino acids, especially glutamate, under lower nutrient conditions (Carillo et al., 2019), and biostimulants, such silicon, could have a stay green effect (Haddad et al., 2018).

Altogether, these results demonstrated that our biostimulants mixed with N fertilizer have strong impacts on N allocation due to a major effect after the heading stage on N uptake and N remobilization efficiency, which leads to improve fruiting efficiency and grain number per spike to finally increase seed yield.

IV.3 Biostimulants supplied to N fertilizer changed the ionome and phytate concentrations and affected protein concentration and quality in wheat grain

IV.3.a Grain ionome and phytate concentrations

Minerals are essentials in human nutrition. Fe, Ca, Zn, and Cl are the most in need of fortification in cereals in order to reduce nutrition deficiency across the world (Gharibzahedi and Jafari, 2017). In our experimental design, macronutrient concentrations in the grain of control plants were in accordance with those found in the literature (Khokhar et al., 2018; Rose et al., 2015; Wieser et al., 2004). The reduction in P by VNT4-D2 could enhance sustainable management of this element in agricultural production *via* the development of “low seed total P” (Raboy, 2020). Regarding S concentration values, these ranged from 0.11 to 0.16%, which are close to the values obtained by Wieser et al. (2004), who studied the influence of S nutrition in wheat flour quality. Nevertheless, these authors demonstrated that the amounts and proportions of single protein types were strongly affected by different S fertilizer applications, mainly due to a dependence on the Cys and Met content of each protein type. We propose that the S reduction in grain due to the formulations might have the same consequence. In addition, the N/S ratio, which was impacted by VNT4-D3 (Supplementary Figure IV.A.3), is known to modulate the duration of accumulation of S-rich grain storage proteins and the rate of accumulation of S-poor grain storage protein (Dai et al., 2015).

In terms of other microelements, we obtained similar results to field conditions for Se and Cu, but higher Mo and B concentrations (Khokhar et al., 2018; Popko et al., 2018; Rose et al., 2015). For Cd, grain concentrations ranged from 0.045 to 0.057 ppm and were thus similar to those measured in hydroponic conditions in durum wheat lines (Perrier et al., 2016; Yan et al., 2018). Although some treatments increased the Cd accumulation in grain, all Cd contents observed in our study were below the maximum grain concentration of 0.2 µg Cd g^{-1} DM that is authorized in Europe (Commission Regulation, 2006).

Wheat is an important dietary source of Fe and Zn for the population, and there is scope to increase grain Fe and Zn concentrations in wheat through breeding or biofortification to help alleviate dietary Fe and Zn deficiencies. In the present study, we found equivalent or higher Fe and Zn contents than under field conditions (Khokhar et al., 2018; Krochmal-Marczak and Sawicka, 2008; Rose et al., 2015; Singh et al., 2018; Zhao et al., 2009). For example, a study that investigated the variation in mineral micronutrient concentrations in grain from wheat lines of diverse origin indicated Fe concentrations that ranged from 28.8 to 50.8 ppm (Zhao et al., 2009), whereas our findings revealed contents ranging from 45.8 to 60.4 ppm. Khokhar et al. (2018) showed that the grain Zn concentration of 36 wheat genotypes varied from 26 to 32 mg kg^{-1}. We observed a similar situation with Zn levels, which ranged from 33.1 to 38.4 ppm in our study. Our results are consistent with Zhao et al. (2009) who reported a spread of grain Zn concentrations from 13.5 to 34.5 mg kg^{-1} in 150 field-grown bread wheat lines. A global summary of grain Zn concentrations in field grown wheat recently reported grain Zn concentrations from 20 to 31 mg kg^{-1}, which is substantially lower than the biofortification target of 40 mg kg^{-1} for the human diet (Chen et al., 2017). Regarding the strong increases of seed yields (from 11% to 52%), our findings showed slight reduction in Fe (-5 to -17%) and Zn (-1 to -14%) contents. In contrast, it has been recently demonstrated that biostimulants enhance Zn concentration and bioavailability in wheat grain (Wang et al., 2020; Yadav et al., 2020). Nevertheless, in our study, the amount of Fe and Zn exported was significantly higher for VNT4 at dose 3 than for the control group (data not shown), which might be due to better remobilization during monocarpic senescence. In addition, all treatments except VNT2-D2 enhanced the export of these two elements (data not shown).

One of the main impacts on grain quality observed in the present study was the significant reduction in phytate in response to VNT1-D1 and VNT4-D2 and D3 (Figure IV.A.4A).

Substantial effort has been invested in (i) wheat cultivars with low phytic acid content in the grain (Ficco et al., 2009; Guo et al., 2015; Guttieri et al., 2006; Raboy, 2020) and (ii) biofortification to enhance Fe and Zn contents and availability in wheat grain (Gomez-Coronado et al., 2017; Hussain et al., 2012; Ramzani et al., 2016; Xia et al., 2018). A major contributor to Fe and Zn deficiencies in the human body is the abundance of phytates in food (Gharibzahedi and Jafari, 2017; Raboy, 2020), which are involved in chelating minerals, such as Zn and Fe (Xue et al., 2015). Indeed, phytate to Fe or Zn molar ratios are considered the best indicators of Fe and Zn availability for humans (Brown et al., 2004; Ciccolini et al., 2017). A phytate/Zn molar ratio lower than 15 is equal to high Zn bioavailability (Gargari et al., 2007), whereas a phytate/Fe molar ratio < 1 is indicative of good Fe bioavailability (Hurrell and Egli, 2010). In our study, the phytate/Zn molar ratio was reduced by 15, 16, and 25% for VNT1-D1, VNT4-D2, and VNT4-D3, respectively, but these values were not significant (Figure IV.A.4B). We observed the same trend for the phytate/Fe molar ratio (-14, -14, and -30%, respectively) and it was significantly lower for VNT4 at dose 3 (Figure IV.A.4C). Therefore, the bioavailability of Fe and Zn in wholemeal flour was improved by VNT4 at the third dose compared with the control. These results are similar to studies that have evaluated the effect of foliar Zn/Fe spraying on quality in wheat grain (Hussain et al., 2012; Xia et al., 2018). However, to the best of our knowledge, this is the first report demonstrating the impact of biostimulants mixed with N fertilizers on the final phytate concentrations in grain.

IV.3.b Protein content and quality

Regarding protein content, Bogard et al. (2010) reported a mean of 11.25% for Récital, whereas Taulemesse et al. (2015) observed a range from 14.2 to 15.8%; our findings were between the two (from 12.5 to 14.2%), which confirmed that our system was comparable to agronomic practices. It is also well documented that higher yield decreases the N and protein content in grain (Hawkesford et al., 2018). Accordingly, in the present study, the protein content in wheat grain was highest in the control, whereas all of the formulations reduced it to 12.5% (Table IV.A.2). Similar to our results, other biostimulants obtained from marine, fungal or protein hydrolysates have not been shown to change the protein content in wheat (Pichereaux et al., 2019; Popko et al., 2018). However, none of the treatments from our work resulted in a protein content below the level required by industry (11.5%) even though this is not the best criterion to ensure baking quality (Rossmann et al., 2019).

Supplementary Table IV.A.4 : Proteomics data

Accession	Description	Average Mass	Significance	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	PTM	Control Intensity (top-3 peptides)	Glutacetine® Intensity (top-3 peptides)	Group Profile (Ratio)
GLT1_WHEAT	Glutenin high molecular weight subunit PC256 (Fragment)	10896	100.48	29	10	3	Oxidation (M), Acetylation (K), Carbamidomethylation, Deamidation (NQ), Propionamide	9.47E+03	3.85E+03	2.46:1.00
A0A0K2QJY6_WHEAT	Alpha/beta-gliadin	35863	75.17	32	6	2	Carbamidomethylation, Deamidation (NQ), Propionamide	4.78E+03	2.22E+03	2.16:1.00
A0A3B5XV32_WHEAT	12S seed storage globulin 1	63867	45.57	51	33	5	Acetylation (K), Carbamidomethylation, Deamidation (NQ), Propionamide	8.89E+03	4.97E+03	1.79:1.00
A0A3B6T7X8_WHEAT	Avenin-like b6	31911	36.11	62	20	9	Oxidation (M), Carbamidomethylation, Deamidation (NQ), Propionamide	1.85E+04	1.19E+04	1.56:1.00
A0A3B6ML15_WHEAT	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase	81186	34.11	9	4	4	Acetylation (K), Deamidation (NQ)	2.43E+04	1.48E+04	1.64:1.00
A0A3B6LKD8_WHEAT	Clathrin heavy chain	193406	30.24	9	11	5	Carbamidomethylation, Deamidation (NQ)	6.16E+03	3.87E+03	1.59:1.00
A0A3B6TZD9_WHEAT	Basic endochitinase	28401	26.89	82	29	5	Oxidation (M), Acetylation (K), Carbamidomethylation, Deamidation (NQ), Propionamide	4.60E+03	3.00E+03	1.53:1.00
RBL_WHEAT	Ribule bisphphate carboxylase large chain	52851	25.23	11	4	2	Carbamidomethylation, Deamidation (NQ), Propionamide	1.09E+04	7.24E+03	1.51:1.00
AVLB1_WHEAT	Avenin-like b1	32727	21.2	45	7	3	Oxidation (M), Carbamidomethylation, Deamidation (NQ), Propionamide	1.20E+04	6.43E+03	1.87:1.00
GLT0_WHEAT	Glutenin high molecular weight subunit DY10	69629	20.71	42	21	6	Oxidation (M), Carbamidomethylation, Deamidation (NQ), Propionamide	4.73E+03	2.37E+03	2.00:1.00
A0A0K2QJX7_WHEAT	Alpha/beta-gliadin	35525	20.38	28	7	2	Carbamidomethylation, Deamidation (NQ), Propionamide	1.47E+04	7.20E+03	2.05:1.00

We finally investigated the effect of Glutacetine® on the quality of wheat grain proteins using proteomic analysis. In order to identify the largest number of bread wheat proteins, we used a large-scale label-free quantitative proteomics approach based on the analysis of the total protein extracted from flour samples. Foliar application of Glutacetine® with N fertilizer at heading did not significantly affect the grain N concentration (Figure IV.A.2) but impacted the quantities of 11 proteins relative to the control (Figure IV.A.5). As suggested by Rossmann et al. (2019), these changes in the grain proteome could have been due to the foliar application of N fertilizers at anthesis and might enhance baking quality. Indeed, the same authors showed that foliar N application increased HMW glutenin while decreasing LMW glutenin and α-/β-/γ-gliadins. In contrast, our results showed that Glutacetine® reduced HMW glutenin, α-/β-gliadins and thus the HMW-GS/LMW-GS ratio, but not the gliadin/HMW-GS ratio. Compared with glutenins, the amount of gliadins was affected disproportionally by the N amount per grain (Supplementary Figure IV.A.3) as detailed by Plessis et al. (2013). Glutacetine® also decreased two avenin-like proteins, which are implicated in dough quality (Zhang et al., 2018). Therefore, it is difficult to conclude whether Glutacetine® application led to a significant improvement in the baking quality. However, it is well documented that α-gliadins (Zörb et al., 2013) and 12S seed storage globulins (Gell et al., 2017) are initiators of the inflammatory response in celiac disease patients. In durum wheat, Pichereaux et al. (2019) have reported the effects of marine and fungal biostimulant treatments on the grain proteome, and especially proteins involved in grain technological properties, such as the gluten protein gamma-gliadin, which increased 100-fold following treatment. In contrast, our study suggests that application of Glutacetine® might improve grain quality through a decline in the immunogenic potential of wheat flour (Altenbach et al., 2020). Most of the proteins that trigger immunological reactions are rich in S-amino acids; their decline is thus strongly linked to the reduction in S content in the grain induced by Glutacetine® (Table IV.A.3). Therefore, foliar application of N fertilizer coupled with Glutacetine® slightly affected the N/S ratio (Supplementary Figure IV.A.3), modulating the accumulation of S-rich and S-poor storage proteins in grain (Dai et al., 2015), and this could have a positive impact on the nutritional and technological qualities of the flour.

IV.4 Organic acids enhanced the effect of glutamic acid in wheat plants

Regarding the composition of formulations, the biggest differences between them was the glutamic acid/organic acids ratio with a minimum of 0.48 for VNT4 and a maximum of 19.6 for VNT1 (Table IV.A.1). This important difference highlighted the beneficial impacts of organic acids on the efficiency of glutamic acid in wheat. Indeed, it is well documented that application of glutamic acid improves plant development (Sun and Hong, 2010), especially by enhancing N metabolism (Haghighi, 2012). Glutamic acid could improve photosynthesis due to a better chlorophyll content and velocity of Rubisco; it also induces the activities of nitrate reductase and glutamine synthase, leading to a higher soluble protein content, leaf N content and N accumulation in leaves (Haghighi and Silva, 2013; Yu et al., 2010). In addition, glutamic acid alleviates abiotic stress such as cold during early vegetative stage in rice (Jia et al., 2017). Amino acids as biostimulants also serve as hormone precursors, signaling factors and regulators of N uptake, root development, and antioxidant metabolism (Khan et al., 2019). Better root development supported by the addition of amino acids can enhance root surface for nutrient uptake. In our study, we did not show consistent change in root surface, but there was a strong N uptake and remobilization during post-heading period compared with the control leading to higher yield and NUE, probably partly due glutamic acid present in the formulations. In general, glutamic acid is mixed with other amino acids before to be applied on plant (Haghighi et al., 2020; Tsouvaltzis et al., 2020). In the present study, glutamic acid was mixed with organic acids except for VNT1. Interestingly, even if when the dose of glutamic acid was decreased by more than 80% in VNT4 compared with VNT1 (Table IV.A.1), the addition of a small amount of organic acids maintained high yield and NUE (Figure IV.A.1B and Table IV.A.2). VNT4-D3 achieved even better results than VNT1. Thus, mixed glutamic acid with organic acids is efficient to enhance the effects of glutamic acid.

IV.5 VNT4 increased yield and NUE under field conditions

To verify the positive effects of VNT4 observed under controlled conditions, we then tested VNT4 at the dose 3 in three contrasted field trials on three different cultivars of bread wheat. While yields are staging in Europe (Brisson et al., 2010), our results indicated that VNT4 improved agronomic parameters, especially yield and NUE (Figure IV.A.6A). VNT4 was more efficient with UAN than urea (Figure IV.A.6C and Table IV.A.4). Even if there was less significant yield (+51.7% yield under controlled conditions, +4.1% under field conditions), our results under field conditions are in accordance with those obtained under greenhouse conditions:

VNT4 enhanced yield and NUE, whereas there is a strong trend to export more N in grains. Nevertheless, the improvement of yield was mainly due to the higher fruiting efficiency and grain number per spike under controlled conditions. In field trials, VNT4 did not change grain number per spike at sites 1 and 3 but improved this parameter at site 2. Indeed, the better yields at sites 1 and 3 were mainly due to the improvement of the spike number per square meter. This difference may be due to the stage of application; the first VNT4 supply was at the end of tillering (BBCH 29) under greenhouse conditions, whereas it was at the beginning of tillering (BBCH 21) under field conditions, which may increase tiller number and thus spike number per square meter. Other biostimulants based on amino acids have also positive effects on spike number per square meter and yield of wheat under field conditions (Popko et al., 2018). Moreover, in this study, the authors did not show consistent change regarding TGW and protein content, which is in agreement with our findings. Indeed, regarding seed quality, while VNT4 decreased N content under greenhouse conditions mainly due to strong yield increase, there was no consistent change under field conditions. Besides, TGW was not affected by VNT4 in both experiments. In the same way, under contrasting N fertilization field trials, significant impacts on wheat grain yield and spike number per square meter were observed with *Bacillus* strains (Nguyen et al., 2019). In rice, controlled-release fertilizer has similar effect on yield and NUE compared with our findings (Sun et al., 2020). In addition, protein hydrolysates are known to have biostimulant properties under field conditions, such as in tomatoes (Polo and Mata, 2017). Finally, other kinds of biostimulants, such as silicon, may enhance yield and seed quality under field conditions, but only under high N fertilization (Laîné et al., 2019). Altogether, these results demonstrated that VNT4 mixed with N fertilizer has a significant impact on yield and NUE, especially when mixed with UAN, which confirmed the results obtained under greenhouse conditions.

V. Conclusion

We demonstrated that biostimulants incorporated into N fertilizers may enhance straw DW (VNT1, VNT2-D1, VNT3, and VNT4 at doses 2 and 3) and seed yield (VNT1, VNT3-D1, and VNT4 at the second and third dose) due to an improvement in the fruiting efficiency and the resulting increased number of grains per ear (Glutacetine®, VNT1, VNT2-D1, VNT3, VNT4-D2, and VNT4-D3). These new formulations of biostimulants were also able to enhance the total N in grain (VNT4-D3) and the NHI (Glutacetine®, VNT1-D1 and VNT4-D3). This was due to

efficient post-heading N uptake (VNT1-D2 and VNT4 at doses 2 and 3), the acceleration of senescence (all formulations), and a strong N remobilization from roots and straw (VNT4-D3). Further studies with lower doses of N will be undertaken in order to understand the regulation of N assimilation and remobilization enzymes and transporters during senescence because strong modifications during this period have been demonstrated (Havé et al., 2017). Indeed, nitrate reductase (NR) activity is highly correlated with the N absorbed post-flowering and also with grain protein content. Further, glutamine synthetase (GS) activity is even more highly correlated with the amount of N remobilized and grain yield than NR activity, so analysis of these enzymes seems essential (Kichey et al., 2007). The formulations also impacted grain quality by reducing the N concentration in the grain, but the protein content stayed above the 11.5 required by industry. In an original way, our proteomic analyses highlighted a novel effect of Glutacetine® on gluten relative to the control. Regarding the grain ionome, the formulations mainly affected S, Na, Fe, and Cd contents and the availability of Fe. Altogether, the results demonstrated that winter wheat was positively impacted by VNT1 and VNT4 (mainly at doses 2 and 3), especially for grain yield, agronomic traits, and grain quality. We also showed that mix glutamic acid with organic acids is efficient to enhance the effects of glutamic acid only (VNT4-D3 compared with VNT1). Finally, the field experiments highlighted that VNT4 applied at the dose 3 and mixed with urea or UAN significantly increased yield and NUE irrespective of the site.

Sustainable agriculture requires not only effective mineral fertilizers containing macro- and microelements but also biostimulants that are a rich source of biologically active compounds. When mixed with mineral fertilizers, such preparations improve the efficiency of nutrient uptake. Indeed, the new formulations presented in the current work allow significant increases in seed yield and grain quality to be achieved. Greenhouse experiments and field trials will continue to verify these biostimulants according to established principles (Ricci et al., 2019) and enable registration of new biostimulant products for release onto the market.

Author contributions

VM, J-CA, and PG designed the experiments. VM and J-CA conducted all the experiments, analysed the data, and wrote the paper. BB performed the proteomic analysis. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

The authors are grateful to the ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie), which has supported this work as part of a Ph.D. thesis (CIFRE 2017/1239), and to the Région Normandie and FEADER for supporting the FIELD-Prot project (EIP-AGRI).

Acknowledgments

The authors deeply thank Vincent Allard for his involvement in this work and his valuable advice. We acknowledge Anne-Françoise Ameline, Patrick Beauclair, Magali Bodereau, Josiane Pichon and Olivier Rose for helping with plant culture and harvesting. The authors thank Julien Pontin for technical assistance with the proteomic analyses (Proteogen). We are most grateful to the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for all the elemental analyses used in this study. We thank Laurence Cantrill for improving and correction of the English in the manuscript.

B. Effets biostimulants de la Glutacétine® et ses formulations dérivées (VNT1 et VNT4) sur le protéome du grain de blé tendre

***Journal of Proteomics*, 2021, https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104265**

Contexte : L'un des principaux bénéfices des biostimulants est l'amélioration de la qualité des produits de récolte. Le blé tendre est une céréale largement cultivée pour ses nombreux débouchés alimentaires. Parallèlement, le consommateur se préoccupe de plus en plus de la qualité de la nourriture qu'il consomme, notamment en réduisant ou supprimant les produits contenant du gluten dans son alimentation. Par ailleurs, la qualité du grain de blé est aussi essentielle pour sa future germination alors que la France est le premier exportateur mondial de semences. Compte tenu des effets bénéfiques des formulations à base de Glutacétine® sur les différents paramètres agronomiques du blé, une étude de l'impact des meilleures formulations sur le protéome de la farine de blé tendre a été conduite.

Objectif : Le but de cette étude est d'évaluer l'effet de trois formulations (Glutacétine®, VNT1 et VNT4) sur le protéome du blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum* L.) et notamment sur les protéines impliquées dans la sensibilité au gluten.

Démarche expérimentale : Les protéines de la farine des grains de blé issue de l'expérimentation en conditions contrôlées (Article A) ont été extraites en deux fractions (KCl et SDS) puis préparées afin d'effectuer une analyse protéomique. Les protéines de chaque extrait ont ensuite été identifiées et quantifiées grâce à une analyse bio-informatique.

Principaux résultats : Cette analyse protéomique a permis d'identifier 4369 protéines. Parmi ces protéines, l'abondance de 9, 39 et 96 d'entre elles a été modifiée par l'application de Glutacétine®, VNT1 et VNT4, respectivement. De plus, 11 protéines ont été impactées par deux biostimulants différents. Les formulations ont influencé principalement des protéines impliquées dans la régulation de la synthèse des protéines, la réponse aux stress biotiques et abiotiques, les fonctions de stockage et les processus de germination.

B. Biostimulant impacts of Glutacetine® and derived formulations (VNT1 and VNT4) on the bread wheat grain proteome

Victor Maignan [1,2], Benoit Bernay [3], Patrick Géliot [2] and Jean-Christophe Avice [1]

[1] Normandie Univ, UNICAEN, INRAE, UMR EVA, SFR Normandie Végétal FED4277, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen, France

[2] Via Végétale, 44430 Le Loroux-Bottereau, France

[3] Plateforme Proteogen, SFR ICORE 4206, Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la paix, 14032, Caen cedex, France

Keywords: Bread wheat, grain quality, nitrogen fertilizer, plant biostimulants, *Triticum aestivum*

Abstract

Nitrogen (N) fertilizer is essential to ensure grain yield and quality in bread wheat. Improving N use efficiency is therefore crucial for wheat grain protein quality. In the present work, we analysed the effects on the winter wheat grain proteome of biostimulants containing Glutacetine® or two derived formulations (VNT1 and 4) when mixed with urea-ammonium-nitrate fertilizer. A large-scale quantitative proteomics analysis of two wheat flour fractions produced a dataset of 4369 identified proteins. Quantitative analysis revealed 9, 39 and 96 proteins with a significant change in abundance after Glutacetine®, VNT1 and VNT4 treatments, respectively, with a common set of 11 proteins that were affected by two different biostimulants. The major effects impacted proteins involved in (i) protein synthesis regulation (mainly ribosomal and binding proteins), (ii) defence and responses to stresses (including chitin-binding protein, heat shock 70 kDa protein 1 and glutathione S-transferase proteins), (iii) storage functions related to gluten protein alpha-gliadins and starch synthase and (iv) seed development with proteins implicated in protease activity, energy machinery, and the C and N metabolism pathways. Altogether, our study showed that Glutacetine®, VNT1 and VNT4 biostimulants positively affected protein composition related to grain quality. Data are available via ProteomeXchange with identifier PXD021513.

I. Introduction

Bread wheat (*Triticum aestivum*) is a major agricultural crop and is a source of proteins, carbohydrates and minerals (Shewry et al., 2012). It is one of the primary staple foods for most of the global population, providing more than 20% of calories and proteins in the human diet. The main crop characteristics sought by producers are yield and protein concentration, which are dependent on adequate soil fertility. Nitrogen (N) fertilizer applications have many benefits for winter wheat as N is an essential element for wheat growth and protein biosynthesis (Zhen et al., 2018). Indeed, low N availability limits growth, yield, and grain quality (Guerrini et al., 2020). Therefore, producers used to apply high N inputs in order to meet crop demand (Pan et al., 2020) but this strategy presents important risks of N leaching and volatilization (Cowan et al., 2019; Ramanantenasoa et al., 2019). In order to avoid N losses, farmers need to modify their fertilizing practices. Thus, to meet both agri-food and environmental requirements, efficient fertilizers mixed with biostimulants (enhanced-efficiency fertilizer) must be developed to optimize nutrient use efficiency, grain quality and limit environmental issues.

New strategies to enhance N use efficiency and grain quality are based on biological compounds that act as biostimulants. Plant biostimulants contain substance(s) and/or micro-organism(s) whose function is to stimulate natural processes to enhance nutrient uptake, nutrient efficiency, tolerance to abiotic stress, and crop quality (du Jardin, 2015). For example, amino acids (AAs), peptides or plant-derived protein hydrolysates could increase leaf N content; this kind of application has elicited a hormone-like activity, enhanced N uptake and consequently crop performances (Colla et al., 2014). A biostimulant is a component, other than a fertilizer, that enhances plant growth when it is applied to plants or the rhizosphere in small quantities. This is why biostimulants can be used to enhance the effectiveness of conventional mineral fertilizers (Nguyen et al., 2019). In bread wheat, chicken feather protein hydrolysate improved the growth of seedlings (Genç and Atici, 2019). Microorganisms such as *Bacillus* strains have also been associated with biostimulant effects on wheat that were modulated by N supply under field conditions (Nguyen et al., 2019). In addition, various crop/biostimulant combinations have been reported to improve nutritional quality such as spinach with seaweed-based extracts (Rouphael et al., 2018), lettuce and rocket with *Trichoderma* (Fiorentino et al., 2018), tomato with sugar cane molasses mixed with yeast

extract (Francesca et al., 2020) or carrot with seaweed exact (Pobereżny et al., 2020). On cereal crops, foliar application of biostimulants has been able to influence the wheat grain ionome (Popko et al., 2018; Wang et al., 2020), technological characteristics (Popko et al., 2018) and also the grain proteome (Pichereaux et al., 2019).

Grain protein concentration and composition are key factors affecting winter wheat quality. They are influenced by wheat genotype, soil fertility and environmental conditions. The increase in N uptake and assimilation due to high N inputs and/or biostimulants has been shown to lead to changes in the protein composition of the grain (Pichereaux et al., 2019; Zhen et al., 2018), which depends mainly on N remobilization efficiency during grain filling (Barbottin et al., 2005). Mature wheat grains contain 10–15% of the dry mass as protein and grain storage proteins (GSPs) represent 60–80% of the total proteins in grain, while metabolic proteins (albumins and globulins) represent 15–20% (Shewry, 2009). All these proteins are accumulated during the effective filling phase of grain development (Shewry et al., 2012).

In wheat grain, the two main GSP fractions are glutenin and gliadin, which when mixed with water form gluten and are thus the main determinants of the rheological and bread-making properties of dough (Wieser, 2007). More precisely, glutenins form polymers that are mainly responsible for the viscoelastic properties of dough, and gliadins are monomeric proteins that confer extensibility (Wieser, 2007). The rheological properties of wheat depend on the balance between these two fractions (Song and Zheng, 2008). When the total amount of N in grain increases, the glutenin fraction remains stable while the gliadin fraction increases and the albumin-globulin fraction decreases (Triboi, 2003). Commonly, gliadins are subdivided into four classes (ω5-, ω1,2-, α/β-, and γ-gliadins) and glutenins are classified into low-molecular-weight subunits (LMW-GS) and high-molecular-weight subunits (HMW-GS) (Wieser, 2007), which are considered to have a large impact on bread-making quality (Barro et al., 1997). Even though GSPs play a key role in determining the unique baking quality of wheat, they are also related to gluten intolerance and celiac diseases (Perrin et al., 2019), and this is especially the case for α/β-gliadins (Sollid et al., 2012). Indeed, a recent study showed that α- and γ-gliadins in bread and durum wheat had the highest density of coeliac toxic motifs (Daly et al., 2020). A reduction in these proteins while maintaining rheological proprieties may be a solution for people with celiac disease (Altenbach et al., 2020).

Albumins and globulins are involved in important functions in grain metabolism and regulation processes (Masci et al., 2000) including various enzymes and polypeptide inhibitors (Arena et al., 2017) such as proteases, oxidoreductases, phosphatases and enzyme inhibitors (Masci et al., 2000). These proteins affect many metabolism pathways and cellular processes like transport, photosynthesis, redox homeostasis, the cell cycle, cell defence, and mitochondrial activity.

Large-scale omics approaches are commonly used to gain an overview of changes taking place in an organism or tissue by identifying the genes, proteins or metabolites involved in a given biological response (Bancel et al., 2019). Mass spectrometry-based proteomics in combination with quantitative differential analysis is a very efficient strategy to identify proteins in various matrices and allows the determination of protein variations under several conditions. When proteomics is used to study the grain response to fertilizer and/or biostimulant application, proteins are expected to be found in either the metabolic fraction or among GSPs. Research has been conducted to investigate protein synthesis and accumulation in developing wheat grains using proteomics (Guo et al., 2012; Hurkman and Tanaka, 2007; Nadaud et al., 2015). Recently, proteomics approaches were carried-out to understand the effect of N and sulfur fertilizers (Bonnot et al., 2017), marine and fungal biostimulant effects (Pichereaux et al., 2019) or to elucidate the impacts of a post-anthesis heat stress (Zhang et al., 2017) on wheat grain proteins. However, to the best of our knowledge, the effects of biostimulants on the winter wheat bread proteome have not been investigated.

The aim of the present study was to determine how the grain proteome is impacted by new biostimulants (Glutacetine®, VNT1, 2, 3 and 4 containing different formulations of organo-mineral complex) that are used as N fertilizer additives. In our previous results (Maignan et al., 2020), a beneficial impact of these tested formulations (especially Glutacetine®, VNT1 and VNT4) was reported on seed yield, post-heading N uptake and N remobilization during the monocarpic senescent process, but their impacts on the grain proteome were not fully investigated. To address this goal, winter wheat plants were cultivated under semi-hydroponic conditions and subjected to local practices of N fertilization (equivalent of 150 kg N ha^{-1}) with the biostimulant formulations added to form an enhanced-efficiency fertilizer. Using a large-scale quantitative proteomics approach, 4369 proteins were

identified and quantified in mature grain. The analysis of protein changes in response to new additives showed several important biological pathways that were affected by biostimulant treatments, including regulation processes, storage functions, bread-making proprieties, stress responses and seed development.

II. Materials and methods

II.1 Experimental design and tissue sampling

Winter wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Récital) was sown in germination trays filled with a mixture of sand and vermiculite (2:1 v:v) supplied with 25% Hoagland nutrient solution [1.25 mM $Ca(NO_3)_2, 4H_2O$; 1.25 mM KNO_3; 0.5 mM $MgSO_4$; 0.25 mM KH_2PO_4; 0.2 mM EDTA, 2NaFe, $3H_2O$; 14 µM H_3BO_3; 5 µM $MnSO_4$; 3 µM $ZnSO_4$; 0.7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$; 0.7 µM $CuSO_4$; 0.1 µM $CoCl_2$] and placed for two weeks under greenhouse conditions (16h light at 20 °C, 8h dark at 16 °C) (Figure IV.B.1). Natural light was supplied by high pressure sodium lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W). After emergence, plants were vernalized in a growth chamber (6°C, photoperiod 8 h) for six weeks. Following vernalization, plants were transplanted into PVC tubes (8 cm diameter x 33 cm high) filled with a sand:perlite mixture (1:1 v:v) for semi-hydroponic culture. The bottom of each pot was perforated to allow excess nutrient solution to drain. Two plants were transplanted into each tube and the tubes were placed vertically in containers (5 tubes per container) in order to obtain a plant density of 250 plants m^{-2}, which is comparable to what is usually observed in the field under local agronomic practices.

Containers were placed in a heated greenhouse (16h light 20 °C, 8h dark at 16 °C) and completely randomized. Natural light was supplied by high-pressure sodium lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) with photosynthesis active radiation (PAR) of 350 µmol m^{-2} s^{-1} at the canopy. During the first 15 days, each tube received 30 ml of a 25% Hoagland nutrient solution three times a day from an automated micro-irrigation system coupled with a percolating recycling system. After tillage, each tube received a nutrient solution without NO_3^- [1.25 mM $CaCl_2, 2H_2O$; 1.25 mM KCl; 0.5 mM $MgSO_4$; 0.25 mM KH_2PO_4; 0.2 mM EDTA, 2NaFe, $3H_2O$; 14 µM H_3BO_3; 5 µM $MnSO_4$; 3 µM $ZnSO_4$; 0.7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$; 0.7 µM $CuSO_4$; 0.1 µM $CoCl_2$]. The N solution (50% urea, 25% NO_3^-, 25% NH_4^+) was split into three inputs: 50 units of N (UN: kg N ha^{-1}) at the tillering stage (GS29), 80 UN at the two-node stage (GS32) and 20 UN at the heading stage (GS59). Five additives to fertilizers (Glutacetine®, VNT1, 2, 3 and 4

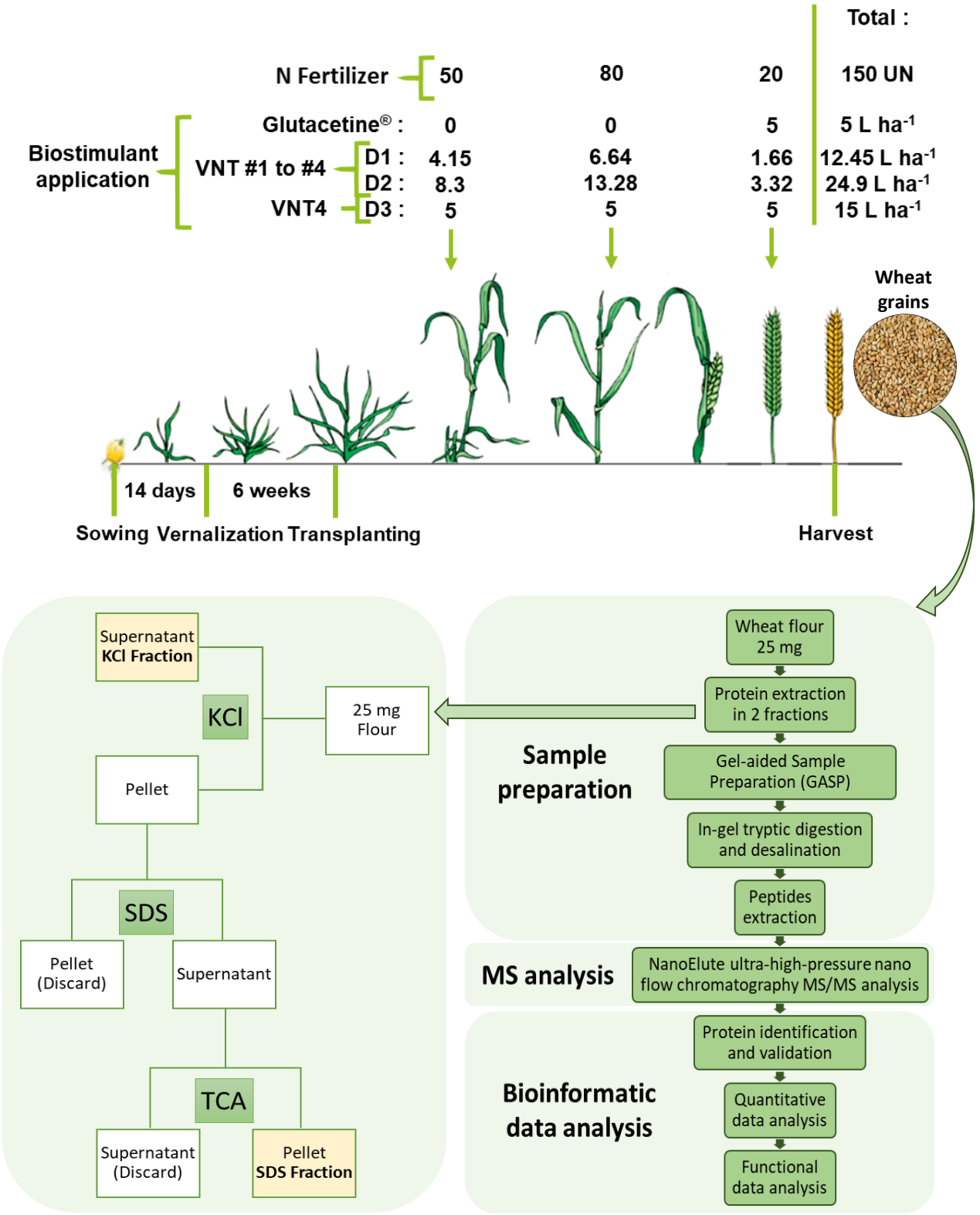


Figure IV.B.1 : Experimental design used to study the effect of Glutacetine®-based formulations on the wheat grain proteome (*Triticum aestivum* L.), protein extraction following the methodology proposed by Hurkman and Tanaka (2006) to separate proteins into two fractions (KCl and SDS) and proteomics analysis workflow of wheat flour samples. Plant culture was carried out under semi-hydroponic conditions on a sand/perlite (1/1) substrate (see Materials and Methods for details). N was provided at the tillering (eq. 50 kg N ha^{-1}), two-nodes (eq. 80 kg N ha^{-1}) and heading (eq. 20 kg N ha^{-1}) stages. Glutacetine® was mixed with N fertilizer at the heading stage at a dose of 5 L ha^{-1} and applied as a foliar treatment. VNT1 and VNT4 were mixed with N fertilizer at different doses: dose 1 was 83 ml kg N^{-1}, dose 2 was 166 ml kg N^{-1} and dose 3 was the equivalent of 3 x 5 L ha^{-1}. Dose 3 was tested only with VNT4. Plants were harvested at maturity (GS89).

provided by the Via Végétale company) were tested in the present study and then compared to a control (N fertilizer alone) (Figure IV.B.1). These formulations contain organo-mineral complexes with different compositions and were detailed in our previous work (Maignan et al., 2020). As recommended by Via Végétale, each plant was sprayed with 2.5 ml of Glutacetine® formulation (5,6 mg ml^{-1}) mixed with N solution only during the last fertilizer application (the first two N fertilizer applications were supplied without Glutacetine®). For the different VNT formulations, three doses were applied (Figure IV.B.1): the first dose (D1; VNT1, 2, 3 and 4) was 83 ml UN^{-1} (total supply: 12.45 L ha^{-1}), the second dose (D2; VNT1, 2, 3 and 4) was 166 ml UN^{-1} (total supply: 24.9 L ha^{-1}) and the third dose (D3; only for VNT4) was the equivalent of 3 x 5 L ha^{-1} (total supply: 15 L ha^{-1}).

Three tubes (six plants) of each treatment were harvested at maturity (GS89). Each tube (two plants) was considered as a biological replicate. Wheat grains were ground to a fine powder using a Retsch MM200 system (Eragny sur Oise, France) for the proteomics analyses.

II.2 Protein extraction and workflow used for proteomics analysis

II.2.a Protein extraction

Proteins were extracted following the methodology proposed by Hurkman and Tanaka (2006), which separated proteins into two fractions (KCl and SDS fractions, Figure IV.B.1) in order to extract as many proteins as possible (Hurkman and Tanaka, 2007). Twenty-five milligrams of wholemeal flour were milled for 5 min at 4°C in cold KCl (50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 5 mM EDTA, pH 7.8). Then the sample was centrifuged for 15 min (12 000 tr min^{-1}, 4°C) and supernatant was collected (corresponding to the KCl fraction, Figure IV.B.1). The pellet was resuspended with 400 µl of SDS buffer (2% SDS, 10% Glycerol, 50 mM DTT, 40 mM Tris-Cl, pH 6.8) for 1 h at ambient temperature. After centrifugation, the supernatant was collected and 40 µl (10% v/v) of cold TCA 72% was added for 2 h of incubation at 4°C. After centrifugation, the resulting pellet was washed three times in ice-cold acetone then dried at room temperature and resolubilized in SDS buffer (corresponding to the SDS fraction, Figure IV.B.1). The protein concentrations were finally determined by the Bradford assay (Bradford, 1976).

II.2.b Protein preparation for proteomics analysis

Five micrograms of each protein extract were prepared using a modified gel-aided sample preparation protocol (Figure IV.B.1, Fischer and Kessler, 2015). Samples were digested

with trypsin/Lys-C overnight at 37°C. For nano-LC fragmentation, protein or peptide samples were first desalted and concentrated onto a µC18 Omix (Agilent) before analysis.

The chromatography step was performed on a NanoElute (Bruker Daltonics) ultra-high-pressure nano flow chromatography system (Figure IV.B.1). Approximately 200 ng of each peptide sample were concentrated onto a C18 pepmap 100 (5 mm x 300 µm i.d.) precolumn (Thermo Scientific) and separated at 50°C onto a reversed phase Reprosil column (25 cm x 75 µm i.d.) packed with 1.6 µm C18 coated porous silica beads (Ionopticks). Mobile phases consisted of 0.1% formic acid, 99.9% water (v/v) (A) and 0.1% formic acid in 99.9% ACN (v/v) (B). The nanoflow rate was set at 400 nl min^{-1}, and the gradient profile was as follows: from 2 to 15% B within 60 min, then an increase to 25% B within 30 min and followed by 37% within 10 min, and subsequently a washing step at 95% B and reequilibration.

II.2.c Mass spectrometry analysis

MS experiments were carried out on a TIMS-TOF pro mass spectrometer (Bruker Daltonics) with a modified nano electrospray ion source (CaptiveSpray, Bruker Daltonics) (Figure IV.B.1). The system was calibrated each week and mass precision was better than 1 ppm. A 1400 spray voltage with a capillary temperature of 180°C was typically employed for ionizing. MS spectra were acquired in the positive mode in the mass range from 100 to 1700 m/z. In the experiments described here, the mass spectrometer was operated in PASEF mode with exclusion of single charged peptides. A number of 10 PASEF MS/MS scans was performed for 1.25 seconds from a charge range of 2-5.

II.2.d Peptide sequencing and protein precursor identification

Before post processing, the samples are analysed using Preview software (ProteinMetrics) to estimate the quality of the tryptic digestion and predict the post-translational modifications present. The result was used for the “bank research / identification” part of the analysis. The fragmentation pattern was used to determine the sequence of the peptide. Database searching was performed using Peaks X+ software. A UniProt *Triticum aestivum* database (September 2019) was used.

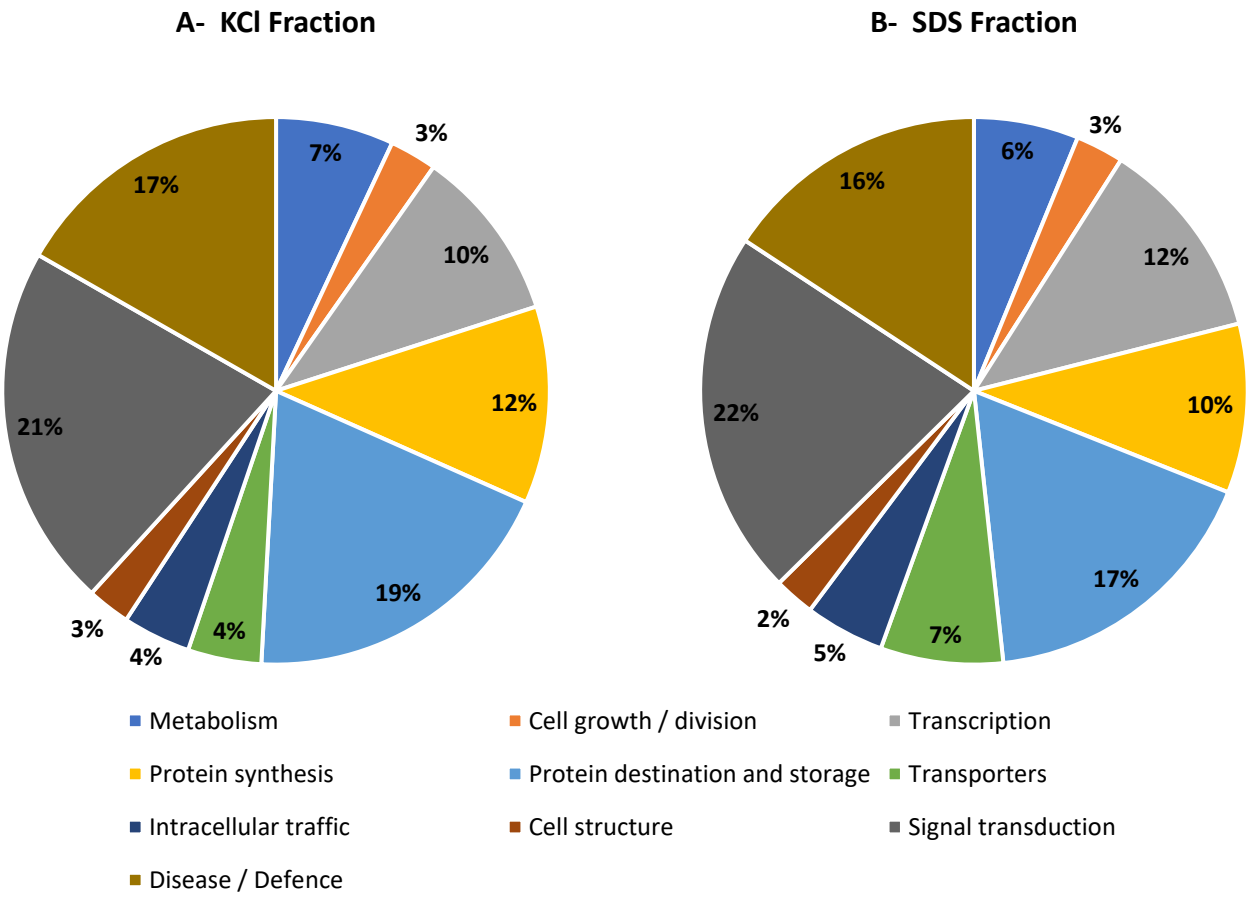
The variable modifications allowed were as follows: C-carbamidomethyl, K-acetylation, methionine oxidation, K and N-term propionamide and deamidation (NQ). In addition, C-propionamide was set as a fixed modification and “Trypsin” was selected as specific enzyme. Mass accuracy was set to 30 ppm and 0.05 Da for the MS and MS/MS modes, respectively.

Data were filtered according to a FDR of 0.1%, two unique peptides and the elimination of protein redundancy on the basis of proteins being evidenced by the same set or a subset of peptides.

II.3 Statistical and functional data analysis

To quantify the relative levels of protein abundance between different groups, four technical replications of each sample (66 LC-MS/MS runs) were analysed using the label-free quantification feature of PEAKS X+ software. Feature detection was separately performed on each sample with the expectation-maximization based algorithm. The features of the same peptide from all replicates of each sample were aligned through the retention time alignment algorithms. Mass error tolerance was set at 30 ppm, ion mobility tolerance (1/k0) at 0.07 and retention time tolerance at 10 min. Normalization factors of the samples were obtained by the total ion current (TIC) of each sample. Quantification of the protein abundance level was calculated using the sum area of the top three unique peptides. Technical repeats of each sample were merged to give a protein detection profile. The protein abundance levels were separately compared for biological replicates. A 1.5-fold increase in relative abundance and a significance ≥ 15 using ANOVA as the statistical method were used to determine enriched proteins. In addition, quality was set >2; peptides must be detected in a least two samples per group and modified forms were excluded.

Subsequently proteins were identified, and functional classifications of the proteins were determined using bioinformatic methods. First, differentially expressed *Triticum aestivum* proteins were blasted using Protein Blast from NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) against *Arabidopsis thaliana* from UniProt. Each accession from *Triticum aestivum* was swapped with by the best corresponding one from *Arabidopsis thaliana*. Then, all proteins or a number of differential expressed proteins were submitted to the PANTHER database (http://www.pantherdb.org/) to perform Gene Ontology (GO). These analyses allowed us to assign a function to the majority of the identified proteins. The functional categories are those defined by Bevan et al (1998) Pathway and functional enrichment were illustrated using STRING Apps (https://string-db.org/) from Cytoscape software (3.8.0). Interactions were obtained by using group-specific and differentially expressed proteins as input and applying a high-confidence filter (higher than 0.4). The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium *via*



<u>Figure IV.B.2</u> : Pie charts of the distribution of proteins from bread wheat based on their ontological class and description. This involves all the proteins identified in flour samples in all conditions (Control, Glutacetine®, VNT1, 2, 3 and 4) being associated with a GO term.

the PRIDE partner repository (Perez-Riverol et al., 2019) with the dataset identifier PXD021513.

III. Results and discussion

From our previous work (Maignan et al., 2020), it was clear that the Glutacetine®, VNT1 and VNT4 biostimulants induced strong differences in N partitioning and N use efficiency. For this reason, in the present study we evaluated the effects of N fertilizers containing these formulations on protein grain composition of winter wheat.

III.1 Global analysis of the grain proteome

In order to identify the greatest number of bread wheat proteins and to determine the variations in the grain proteome after applications of Glutacetine®-based biostimulants, we used a large-scale label-free quantitative proteomic approach based on the analysis of two protein extracts from flour samples. Proteins were extracted using an optimal protocol and were prepared for mass spectrometric analysis for identification, validation and quantification (for details see the Materials and Methods section and Figure IV.B.1).

We identified a total of 2761 proteins in the KCl fraction and 2961 proteins in the SDS fraction, leading to 4369 proteins identified in total. To characterize this dataset, a functional analysis based on Gene Ontology (GO) terms for molecular functions was conducted. After removing the redundant protein codes, 1219 and 1340 proteins were associated with protein families corresponding to a unique function in the KCl and SDS fractions, respectively. These identified proteins were grouped according to their ontological class and description (Bevan et al., 1998).

The analysis showed that the main protein families associated with bread wheat flour were involved in signal transduction (21% and 22% for the KCl and SDS fractions, respectively), protein destination and storage (19% and 17%, respectively) and disease/defence (17% and 16%, respectively, Figure IV.B.2A and B). We then observed greater numbers of proteins in connection with transporter activity in the SDS fraction (7%, Figure IV.B.2B) than in the KCl fraction (4%, Figure IV.B.2A). However, we did not observe significant changes between the two fractions regarding proteins involved in protein synthesis (10-12%), transcription (10-12%), metabolism (6-7%) or intracellular trafficking (4-5%, Figure IV.B.2A and B). Finally,

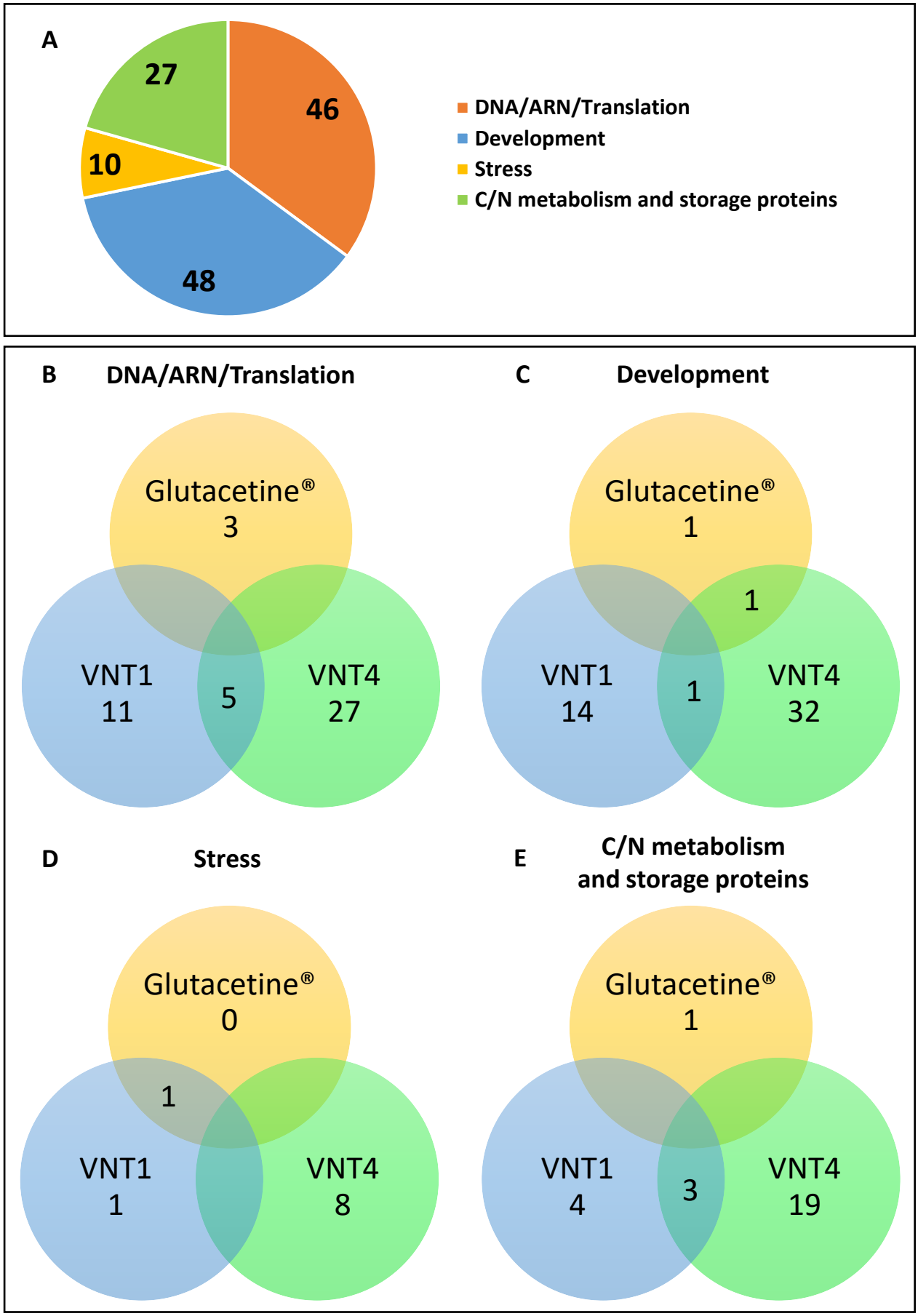


Figure IV.B.3 : (A) Significant over- or under-represented proteins identified in mature grains of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) after Glutacetine®, VNT1 and VNT4 treatments, and Venn diagrams (B to E) showing the distribution of differential proteins across different types of metabolism. Significant over- or under-represented proteins in Glutacetine®-based biostimulants involved (B) in DNA/ARN/Translation metabolism, (C) in seed development, (D) in response to various stresses and (E) in C and N metabolism and storage proteins.

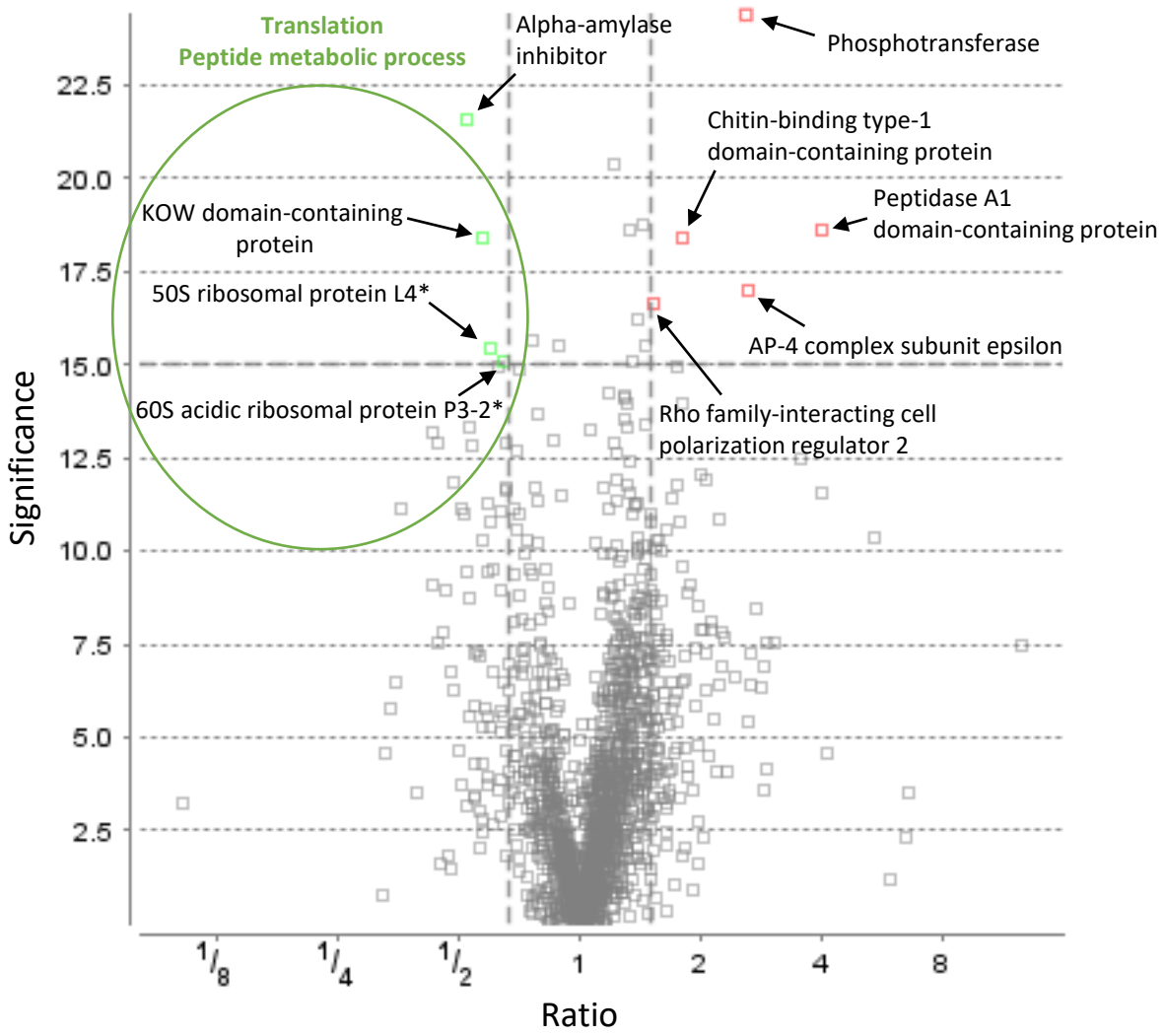
protein families associated with cell structure, cell growth and division were the least represented (≤ 3%, Figure IV.B.2A and B).

The same protein analysis based on GO terms was also performed using the proteins identified in each condition independently. It showed a similar protein distribution for all conditions (data not shown). It can thus be concluded that there is no effect of Glutacetine®-based biostimulants on the overall protein category distribution in the grain.

We then performed a quantitative proteomic analysis in order to determine the specific impacts of biostimulants on the abundance of each protein in wheat grain. We selected three biostimulants (Glutacetine®, VNT1 and VNT4) for comparison to the control group because these formulations showed the best physiological results as previously reported (Maignan et al., 2020). Irrespective of the dose, quantitative proteomic analysis revealed that Glutacetine®, VNT1 and VNT4 modified the abundance of proteins involved in different processes such as responses to biotic and abiotic stresses, seed quality during grain filling (proteins and starch accumulation) and proteins that might be useful for grain and seed development (energy machinery, protease activity and C and N metabolism pathways). These changes in the wheat grain proteome are detailed in the following sections.

III.2 Proteins involved in protein synthesis regulation processes are affected by Glutacetine®-based formulations

The abundance of 46 proteins associated with the transcription and translation processes was modified by Glutacetine®-based formulations (Figure IV.B.3A). In response to Glutacetine® treatment, a volcano plot (Figure IV.B.4) clearly indicated that among under-represented proteins, three proteins were involved in translation process (KOW domain-containing-protein, 50S ribosomal protein L4, 60S acidic ribosomal protein P3-2). In contrast, 16 proteins involved in the transcription and translation processes were over-represented in VNT1 treatments (Figure IV.B.3B), and comprised mainly ribosomal and binding proteins (doses 1 and 2, Tables IV.B.1 and 2). As observed for VNT1, proteomics analysis indicated that VNT4 treatments increased the abundance of 32 proteins involved in DNA, transcriptional and translation metabolic processes, and especially ribosomal proteins (Tables IV.B.3 and 4, Figure IV.B.3B). Interestingly, five ribosomal proteins (W5H631_WHEAT, A0A3B6AVD3_WHEAT, A0A1D5W7I4_WHEAT, A0A3B6DD91_WHEAT, A0A3B6DCS5_WHEAT) were increased by VNT1 and VNT4 at all doses (except for the ribosomal_L18_c domain-containing protein,



<u>Figure IV.B.4</u> : Quantitative proteomics analysis of KCl extraction from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) grains after application of Glutacetine® formulation mixed with N fertilizer. Plant culture was carried out under semi-hydroponics conditions on sand/perlite (1/1) substrate (see Materials and Methods for details). N was provided at the tillering (eq 50 kg N ha^{-1}), two-node (eq 80 kg N ha^{-1}) and heading (eq 20 kg N ha^{-1}) stages. Glutacetine® was mixed with N fertilizer at the heading stage at a dose of 5 L ha^{-1} and applied as a foliar treatment. Seeds were harvested at maturity (GS89). Statistical analysis was performed from three biological replicates. A 1.5-fold increase in relative abundance and a significance ≥ 15 using ANOVA as the statistical method were used to determine the enriched proteins. Quality was set at greater than two peptides detected in a least two samples per group and modified forms were excluded. (**Arabidopsis thaliana* name)

which was reduced by VNT4 at dose 1, Tables IV.B.2, 3 and 4, Figure IV.B.3B). Histones are also involved in the regulation of transcription, impacting the effectiveness of the transcriptional machinery (Bonnot et al., 2017). For instance, Histone H3, which is one of the main histones involved in the structure of chromatin in eukaryotic cells (Xu and Jiang, 2020), was under-represented at doses 1 and 3 but over-represented at dose 2 (the highest dose, Figure IV.B.1) of VNT4 (Table IV.B.3). Our results also revealed that VNT4 treatments increased the abundance of endoribonuclease dicer homolog 1 (Table IV.B.3), which is required for the maturation of RNA. Indeed, loss of this function affects microRNA accumulation and causes developmental defects in rice (Liu et al., 2005). Among differential proteins, there are many ribosomal compounds that were always over-represented at doses 2 and 3 (Tables IV.B.3 and 4), guaranteeing efficient protein synthesis. Therefore, application of Glutacetine®, VNT1 and VNT4 have an impact on the regulation of the transcriptional and translational machinery. Over-representation of regulatory proteins after application of Glutacetine®-based formulations might impact the cellular pathways and functions related to development, defence and responses to biotic and abiotic stresses, and N and C metabolism as well as quality aspects of grain such as accumulation of reserve proteins or starch content.

III.3 VNT1 and VNT4 provoke changes in proteins involved in development

Regarding seed development, Glutacetine®-based formulations modified the abundance of 48 proteins involved in these processes (Figure IV.B.3A). In fact, VNT4 clearly changed the expression of 34 proteins implicated in development, while VNT1 and Glutacetine® only affected 15 and two proteins, respectively (Figure IV.B.3C). In response to VNT1 treatment, quantitative proteomic analysis revealed the over-representation of alpha-galactosidase (Zha et al., 2012) and protein flowering locus T (FT, Table IV.B.1). Analysis of two-dimensional electrophoresis of coffee beans showed the accumulation of alpha-galactosidase, which is one of the three main enzymes involved in the modification and degradation of galactomannans in the cell wall during the maturation of grains (Marraccini et al., 2005). Like LEA proteins and dehydrin, alpha-galactosidase can contribute to the integrity of cell membranes and subsequently to the conservation of metabolites responsible for coffee beverage quality (Livramento et al., 2017). In addition, VNT1 led to an increase in the abundance of E3 ubiquitin-protein ligase (Table IV.B.2), which belongs to the ubiquitin/26S proteasome system. Interestingly, the abundance of the 26S proteasome non-ATPase

regulatory subunit (Table IV.B.4) was also increased by VNT4 application. The ubiquitin/26S proteasome system is one of the main mechanisms employed by plants to control growth and development. E3 ubiquitin-protein ligase functions as a regulator of MED25 stability, which is a positive regulator of FT expression, and which consequently is able to promote flowering (Iñigo et al., 2012). FT and Flowering Locus C (FLC) are two proteins involved in seasonal sensing (including temperature and day length) that are required to control and optimize the timing of developmental transitions in plants. During reproductive development in *Arabidopsis*, Chen and Penfield (2018) have reported that the mother plant uses FLC and FT to modulate progeny seed dormancy in response to temperature. Indeed, FT regulates seed dormancy through *FLC* gene expression and regulates the chromatin state by activating antisense *FLC* transcription in response to the temperature changes that characterize seasons. In our study, the increase in alpha-galactosidase and FT protein suggested that the maturation process as well as seed dormancy in wheat grain are improved by the VNT1 biostimulant. In addition, we have previously observed that VNT1 treatment led to a better fruiting efficiency and grain number per spike in bread wheat (Maignan et al., 2020). Thus, it could be interesting to verify whether VNT1 application also provokes changes in the abundance of FT protein during the transition between the vegetative and reproductive stages. Indeed, this could be related to improvements observed during the flowering stage and consequently the increase in fruiting efficiency. Furthermore, our proteomics study indicated that the three doses of VNT4 increased the abundance of three proteins (isocitrate dehydrogenase, D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, UDP-arabinopyranose mutase 3; Table IV.B.4) that are involved in flowering. Basically, isocitrate dehydrogenase is mainly expressed in the pollen (Lemaitre and Hodges, 2006), D-3-phosphoglycerate dehydrogenase is required for mature pollen development (Toujani et al., 2013) and UDP-arabinopyranose mutase 3 is necessary for pollen wall morphogenesis (Sumiyoshi et al., 2015). Therefore, improvements to pollen development might increase flowering efficiency, which would be in agreement with the better fruiting efficiency of wheat observed after VNT4 treatment (Maignan et al., 2020).

Other proteins involved in seed development were differentially accumulated specifically in response to VNT4. Among them were enzymes of glycolysis, the Krebs cycle and other ATP synthesis processes, which are essential to provide sufficient energy in order to support seedling growth at early stages. Phosphoglycerate kinase (Table IV.B.3) and triose

Table IV.B.1 : Heatmap of significantly over- or under-represented proteins identified in mature grains of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) after VNT1 treatment in the KCl fraction.

Accession	Protein name (*Arabidopsis thaliana name)	Significance	Group ratios		
			Control	VNT1-D1	VNT1-D2
A0A3B5ZS63_WHEAT	Early nodulin-like protein 2*	17.48	1	0.49	0.44
A0A3B6RB11_WHEAT	AAI domain-containing protein	18.99	1	0.61	0.83
A0A3B6KJY7_WHEAT	BHLH domain-containing protein	26.13	1	1.96	0.85
A0A3B6CE96_WHEAT	Molybdopterin molybdenum transferase	17.34	1	1.73	1.17
A0A1D6B2F7_WHEAT	Inhibitor_I29 domain-containing protein	22.97	1	2.02	1.26
A0A3B6EDY7_WHEAT	Glutamine--tRNA ligase, cytoplasmic*	18.46	1	1.69	1.28
A0A077RPL6_WHEAT	RuvB-like helicase	21.1	1	1.58	1.36
A0A3B6THV1_WHEAT	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	17.53	1	1.85	1.38
A0A3B6LGE3_WHEAT	Valine--tRNA ligase, mitochondrial 1*	16.08	1	1.5	1.42
A0A3B5YWY1_WHEAT	Methionine aminopeptidase	22.42	1	1.57	1.44
D8L9M8_WHEAT	RNA recognition domain containing protein, expressed	18.52	1	1.36	1.57
A0A3B6NP54_WHEAT	Alpha-galactosidase	16.97	1	1.74	1.59
A0A3B6MPX2_WHEAT	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	16.26	1	1.38	1.6
W4ZNQ8_WHEAT	Cytochrome c domain-containing protein	17.93	1	1.98	1.6
A0A3B6QNF4_WHEAT	B3 domain-containing protein REM8*	17.31	1	1.73	1.66
A0A3B6R9D3_WHEAT	Protein FLOWERING LOCUS T*	26.18	1	1.92	1.7
A0A3B5Y631_WHEAT	Sulfhydryl oxidase	15.21	1	2.01	1.74
A0A3B6GXR9_WHEAT	Chitin-binding type-1 domain-containing protein	15.13	1	2.08	1.83
A0A3B5Y1Z9_WHEAT	Patellin-5*	15.34	1	1.47	1.86
A0A3B6GS44_WHEAT	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1*	15.94	1	0.96	2.14

phosphate isomerase (Table IV.B.4), which are major enzymes used in glycolysis (Dumont et al., 2016; Rosa-Téllez et al., 2018), were also affected by VNT4. Moreover, a protein kinase domain-containing protein, interacting selectively and non-covalently with ATP, was impacted by VNT4 in the same way as phosphoglycerate kinase (Table IV.B.3). However, VNT4 application led to increased abundance of isocitrate dehydrogenase (all doses, Table IV.B.4), an enzyme that catalyses the oxidative decarboxylation of isocitrate to produce CO_2 and α-ketoglutarate, which is an intermediate metabolite in the Krebs cycle. Furthermore, succinate dehydrogenase oxidizes succinate to fumarate in the mitochondrial electron transport chain to produce ATP. In plants, this enzyme also influences photosynthesis, the function of stomata, root elongation and fungal defence (Huang and Millar, 2013). Thus, the over-representation of succinate dehydrogenase after VNT4 application (all doses, Table IV.B.4) may contribute to seedling development. These examples highlighted the effects of biostimulants such as VNT4 on seedling energy metabolism and its support of germination and the early growth stages.

When energy machinery is active and provides carbohydrates for germination, the N pathway and transporters must also work efficiently to maintain an appropriate C/N ratio. Interactions between C and N pathways are important in plants to ensure assimilation of these two major nutrients, and to thus allow maximum growth and yield (Krapp et al., 2005). This is why proteases are crucial to increase AA availability because they can be used for synthesis of new proteins that are essential for seed development and germination. For example, basic secretory protease, which catalyses the hydrolysis of a peptide bond, was over-represented at doses 2 and 3 of VNT4 (Table IV.B.3). In addition, our results showed that the abundance of aminopeptidases and the proteasome system was increased under VNT4 treatment, irrespective of the dose (Table IV.B.4). Proteasomes degrade specific proteins that have been targeted for proteolysis by ubiquitination, especially during early developmental stages (Ito et al., 1997; Genschik et al., 1994). In addition, aspartic proteinase, which is involved in several physiological processes in plants including germination (Mazorra-Manzano and Yada, 2008), was also over-represented by VNT4 treatments (Table IV.B.4). The fact that multiple proteases are induced after VNT4 application indicated that this formulation may facilitate wheat seed germination and the early growth stages by providing free AAs.

Table IV.B.2 : Heatmap of significantly over- or under-represented proteins identified in mature grains of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) after VNT1 treatment in the SDS fraction.

Accession	Protein name (**Arabidopsis thaliana* name)	Significance	Group ratios		
			Control	VNT1-D1	VNT1-D2
AVLBB_WHEAT	Avenin-like b11	18.21	1	0.46	0.45
A0A3B5Y162_WHEAT	Lipoxygenase	23.98	1	0.54	0.57
A0A3B6EFD9_WHEAT	AAA domain-containing protein	22.53	1	0.46	0.61
A0A3B5ZXP6_WHEAT	DNA topoisomerase 2	17.04	1	0.63	0.67
Q45NB7_WHEAT	Glutamine synthetase	20.02	1	1.76	1.21
W5EUY8_WHEAT	25.3 kDa vesicle transport protein*	16.41	1	1.52	1.32
A0A3B6JNC2_WHEAT	Proteasome subunit alpha type	21.11	1	1.61	1.48
A0A3B6MUK2_WHEAT	E3 ubiquitin-protein ligase MBR2*	17.29	1	1.29	1.51
W5FAY5_WHEAT	Actin	20.18	1	1.67	1.54
A0A3B5YYY2_WHEAT	Coatomer subunit delta	17.3	1	1.35	1.58
Q2WGB1_WHEAT	Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic	15.27	1	1.44	1.6
W5H631_WHEAT	60S ribosomal protein L27	21.8	1	1.5	1.62
W5DZS4_WHEAT	NAD(P)-bd_dom domain-containing protein	21.11	1	1.28	1.65
A0A3B6AVD3_WHEAT	Small nuclear ribonucleoprotein G	17.52	1	1.58	1.66
A0A1D5W7I4_WHEAT	Ribosomal protein	16.36	1	1.25	1.68
A0A3B6DD91_WHEAT	Ribosomal_L18_c domain-containing protein	20.84	1	1.3	1.7
A0A077RTP7_WHEAT	Splicing factor U2af small subunit B*	16.39	1	1.64	1.7
A0A3B6DCS5_WHEAT	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein	19.43	1	1.63	1.82
A0A3B6AVJ0_WHEAT	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	21.93	1	1.16	1.87

While energy metabolism is essential for seed germination, the hormonal balance is also important during this specific period. Accordingly, the abundance of patellin-5 in response to VNT1 application is noteworthy (Table IV.B.1). Indeed, patellin proteins are accumulated in embryos, primary roots, lateral root primordia and developing stomata at all stages of embryogenesis (Zhou et al., 2019). Patellins are more specifically expressed in pericycle cells in the root elongation zone and in the basal meristem of the root tip. Interestingly, they are redundantly required for auxin-mediated root meristem size and gravitropic growth regulation, so these proteins might participate in the auxin feedback in plants (Tejos et al., 2018). Thus, over-representation of proteins involved in hormonal pathways after application of Glutacetine®-based formulations may support the early stages of development. Besides, their presence in seeds could be due to responses to biotic and abiotic stresses during grain filling.

III.4 Glutacetine®-based formulations lead to changes in proteins involved in defence and responses to stress

In response to different stresses, the abundance of 10 proteins was modified by Glutacetine®-based formulations (Figure IV.B.3D). For example, Glutacetine® and VNT1 application led to increases in the abundance of chitin-binding type-1 domain-containing protein. The present study also highlighted that application of VNT4 in bread wheat increased the abundance of basic endochitinase B (at all doses, Table IV.B.4). Previously, Maignan et al. (2020) also showed that Glutacetine® affected the amount of a basic endochitinase C. Chitin-binding protein is associated with resistance against insects (Giovanini et al., 2007) and it is well documented that the chitinase protein family is essential for wheat resistance against pathogens like *Fusarium* (Shin et al., 2008). In addition, cytosolic triose phosphate isomerase, over-represented in VNT4 treatments (Table IV.B.4), is a key component in XA3/XA26-mediated resistance against bacterial blight (Yanyan Liu et al., 2018). In contrast, α-amylase inhibitor protein was substantially under-represented after Glutacetine® application (Figure IV.B.4). This protein inhibits insect and human α-amylases, and may help limit insect infestation during storage of grains because the inhibitor can slow the growth of insect pests that attack cereal grains, and to control human diet (Feng et al., 1996). On the other hand, an α-amylase inhibitor was identified as a major wheat flour allergen that plays an important role in the pathogenesis of baker's asthma disease (Fränken et al., 1994). Marine and fungal

Table IV.B.3 : Heatmap of significantly over- or under-represented proteins identified in mature grains of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) after VNT4 treatment in the KCl fraction.

Accession	Protein name *_Arabidopsis thaliana_ name, **_Boswellia serrata_ name	Significance	Group ratios			
			Control	VNT4-D1	VNT4-D2	VNT4-D3
A0A3B6IPF3_WHEAT	eIF2B_5 domain-containing protein	21.91	1	0.44	1.42	0.54
W5HK94_WHEAT	Ureide permease 2*	16.15	1	0.66	1.2	0.55
F8WTQ6_WHEAT	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	21.55	1	0.53	0.76	0.6
AVLA1_WHEAT	Avenin-like a1	15.32	1	0.69	0.96	0.65
A0A3B6PPX3_WHEAT	Histone H3-lysine	23.59	1	0.9	3.52	0.79
EF1A_WHEAT	Elongation factor 1-alpha	18.23	1	0.62	0.8	0.92
A0A3B6N1I9_WHEAT	Phosphoribosylformylglycinamidine cyclo-ligase*	20.73	1	0.64	0.74	1.02
A0A3B6DD91_WHEAT	Ribosomal_L18_c domain-containing protein	22.32	1	0.5	1.42	1.04
A0A3B6RQL1_WHEAT	Phosphoglycerate kinase	21.66	1	0.4	2.05	1.07
A0A3B6I1A6_WHEAT	Exostosin domain-containing protein	18.44	1	1.62	2	1.08
A0A3B6AXE5_WHEAT	Protein kinase domain-containing protein	22.32	1	0.82	1.74	1.13
A0A3B5Y0D2_WHEAT	PX domain-containing protein	19.46	1	1.28	0.63	1.25
A0A1D5UZ50_WHEAT	Endoribonuclease Dicer homolog 1*	15.84	1	1.3	1.59	1.28
IBB3_WHEAT	Bowman-Birk type trypsin inhibitor	19.89	1	1.35	2.72	1.43
A0A3B6RMW1_WHEAT	RING-type domain-containing protein	20.75	1	1.1	1.58	1.46
GLT5_WHEAT	Glutenin, high molecular weight subunit DX5	15.51	1	1.04	1.54	1.49
A0A3B5Y2I6_WHEAT	FBPase domain-containing protein	18.71	1	1.24	1.29	1.52
A0A3B6MKY4_WHEAT	Glutathione S-transferase Z1*	24.52	1	0.99	1.16	1.59
A0A3B5YWB5_WHEAT	Basic secretory protease**	15.4	1	0.88	1.65	1.62
A0A3B6C1R6_WHEAT	Amine oxidase	16.07	1	1.17	1.64	1.63
A0A3B6LTN4_WHEAT	60S ribosomal protein L13a-4*	19.11	1	1.09	1.2	1.63
A0A3B6JN53_WHEAT	Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1	28.64	1	1.09	1.49	1.72
W5ECL2_WHEAT	Ribosomal_L2_C domain-containing protein	16.07	1	1	1.15	1.73
Q9LEE2_WHEAT	Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic	17.62	1	1.31	1.42	1.78
A0A3B6KAS9_WHEAT	CN hydrolase domain-containing protein	19.99	1	1.27	1.05	1.81
A0A3B6MRM1_WHEAT	PKS_ER domain-containing protein	21.55	1	1.14	1.42	1.82
W5HTZ1_WHEAT	60S ribosomal protein L17-1*	17.52	1	1.32	1.4	1.85
A0A3B6FIB9_WHEAT	PALP domain-containing protein	16.01	1	2.71	1.6	4.38

biostimulant treatments have also affected these types of proteins in durum wheat (Pichereaux et al., 2019).

Crops are also increasingly subjected to abiotic stress such as high temperature, which has strong impacts on seed yield and quality. In our study, the 70 kDa heat shock protein 1 was over-represented in VNT4 treatment, irrespective of the dose (+23% minimum, Table IV.B.4). This protein increases in response to high temperature during grain filling (Hurkman et al., 1998). This result demonstrated that VNT4 causes differential expression of this heat-stress-responsive protein, which is in accordance with a previous study on the effects of biostimulants in durum wheat (Pichereaux et al., 2019). Furthermore, VNT4 application induced proteins involved in responses to other abiotic stresses. For example, aminopeptidase from the shoots of triticale seedlings changes its activity under suboptimal growth conditions such as metal, drought or salinity stress (Szawłowska et al., 2011). RING-type protein from wheat is involved in dehydration and salinity stress (Agarwal and Khurana, 2020) and negatively regulates drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* (Liu et al., 2018). RRM domain-containing proteins are RNA-recognition motifs that confer salt and drought tolerance (Ben Saad et al., 2018) and glutamate dehydrogenase contributes to proline accumulation in leaves of wheat seedlings exposed to different salinity (Wang et al., 2007). Interestingly, these three proteins were over-represented following VNT4 application at all doses (Table IV.B.4), confirming the effects of this formulation on proteins involved in responses to different abiotic stresses.

Under the VNT1 and VNT4 treatments, the abundance of abiotic-stress and defence-response proteins involved in oxidative stress was also significantly increased. For example, VNT1 increased the abundance of (i) sulfhydryl oxidase (Table IV.B.1), which improves cell redox homeostasis, (ii) methionine aminopeptidase (Table IV.B.1), which is involved in freezing (Jeong et al., 2011) and (iii) alpha-galactosidase (Table IV.B.1), which is expressed during osmotic tolerance (Daldoul et al., 2012). In addition, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (Table IV.B.1) enhances oxidative stress tolerance in *Arabidopsis thaliana via* a higher proline content and increased activities of antioxidant enzymes (Zhang et al., 2020). Actin (Table IV.B.2) is also required for resistance to pathogens (Tang et al., 2016; Zhang et al., 2017) or abiotic stresses (Ouellet et al., 2001). It is also noticeable that VNT1 increased the abundance of (i) the patellin protein family (Table IV.B.1), involved in stress

Table IV.B.4 : Heatmap of significantly over- or under-represented proteins identified in mature grains of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) after VNT4 treatment in the SDS fraction.

Accession	Protein name **Arabidopsis thaliana* name	Significance	Group ratios Control	VNT4-D1	VNT4-D2	VNT4-D3
J7HT09_WHEAT	Alpha-gliadin	29.79	1	0.67	0.79	0.11
A0A3B6TIG9_WHEAT	AAI domain-containing protein	18.21	1	0.5	0.42	0.4
AVLBB_WHEAT	Avenin-like b11	15.13	1	0.77	0.59	0.44
A0A0K2QJX7_WHEAT	Alpha/beta-gliadin	17.26	1	0.39	0.55	0.46
GDA5_WHEAT	Alpha/beta-gliadin A-V	17.27	1	0.27	0.46	0.47
I0IT63_WHEAT	Alpha/beta-gliadin	16.37	1	0.38	0.54	0.62
A0A3B5Y2C5_WHEAT	BOWMAN_BIRK domain-containing protein	20.78	1	0.91	0.81	0.67
GDA6_WHEAT	Alpha/beta-gliadin clone PW1215	20.58	1	0.57	0.51	0.7
G0Z6F1_WHEAT	26s proteasome non-ATPase regulatory subunit	20.78	1	1.4	1.56	1.1
A0A2X0SGH3_WHEAT	PI31_Prot_N domain-containing protein	36.04	1	1.47	1.62	1.11
A0A3B6SU01_WHEAT	Basic endochitinase B*	21.71	1	1.72	1.66	1.13
A0A1D6S518_WHEAT	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	21.78	1	1.46	1.66	1.17
A0A3B6CEE9_WHEAT	Probable UDP-arabinopyranose mutase 5*	17.89	1	1.45	1.51	1.18
A0A3B6PLE4_WHEAT	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	15.13	1	1.32	2.5	1.18
A0A3B6NM56_WHEAT	Proteasome subunit alpha type	26.49	1	1.53	1.77	1.19
A0A1D5SLI4_WHEAT	40S ribosomal protein S4	21.27	1	1.28	1.58	1.19
A0A3B5YRG3_WHEAT	Glutathione S-transferase DHAR2*	16.48	1	1.67	1.58	1.2
A0A3B6B623_WHEAT	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	15.55	1	1.51	1.57	1.2
A0A077RSI3_WHEAT	Triosephosphate isomerase, cytosolic*	19.49	1	1.65	1.68	1.21
A0A3B6KQV6_WHEAT	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	17.77	1	1.68	1.67	1.21
A0A3B6PR06_WHEAT	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 4*	19.34	1	1.5	1.7	1.23
W5GLX4_WHEAT	Heat shock 70 kDa protein 1*	15.44	1	2.65	1.66	1.23
A0A3B6JNU8_WHEAT	40S ribosomal protein S3a	24.91	1	1.34	1.65	1.25
A0A3B6IUL2_WHEAT	Phosphoserine aminotransferase	21.3	1	1.68	1.63	1.25
A0A3B6EAP4_WHEAT	Probable inactive receptor kinase*	27.3	1	1.28	1.67	1.25
W5AKQ3_WHEAT	RRM domain-containing protein	20.62	1	1.58	1.39	1.27
A0A3B6JED3_WHEAT	Protein kinase domain-containing protein	15.74	1	1.36	1.5	1.27
A0A3B6QKP7_WHEAT	F-box domain-containing protein	20.21	1	1.78	1.88	1.28
W5B985_WHEAT	Proliferating cell nuclear antigen	18.49	1	1.46	1.66	1.28
W5AVS5_WHEAT	MPN domain-containing protein	15.14	1	1.5	1.69	1.29
Q6JGT1_WHEAT	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase	19.37	1	1.87	1.32	1.29
A0A3B6EF27_WHEAT	Ligase_CoA domain-containing protein	22.05	1	1.63	1.76	1.3
A0A3B6FTH5_WHEAT	Probable glutamate carboxypeptidase*	17.65	1	1.83	1.84	1.3

(continued on next page)

tolerance regulation (Zhou et al., 2019) and (ii) E3 ubiquitin ligase (Table IV.B.2), belonging to the Ubiquitin/26S proteasome system, which is also strongly implicated in cellular responses to biotic and abiotic stresses (Santner and Estelle, 2010). For instance, the *Arabidopsis* E3 ubiquitin ligase AtAIRP1 is a positive regulator of the abscisic acid (ABA)-dependent response to drought stress (Ryu et al., 2010).

Moreover, proteomics analysis of grains from plants subjected to VNT4 indicated that eight proteins are involved in stress and defence responses (Figure IV.B.3D). Among them, two proteins are involved in polyamine pathways that are key metabolites in the defence system. Amine oxidases play a major role in the catabolism of polyamines (especially putrescine, spermidine and spermine) in plant tissues and the CN hydrolase domain-containing protein is associated with putrescine biosynthesis (Asthir et al., 2010). The first enzyme was over-represented in VNT4 treatments, irrespective of the dose, and the abundance of the second protein was only increased relative to the control by doses 1 and 3 (Table IV.B.3). Oxidoreductase activity is also an important process during biotic and abiotic stresses that controls cellular redox homeostasis. In our study, several differential proteins involved in these mechanisms were identified including the PKS_ER domain-containing protein, which was over-represented by VNT4 at all doses (Table IV.B.3). In addition, glutathione is a major cellular redox buffer that acts as an anti-oxidant by quenching reactive oxygen species (Jez, 2019). Our results showed that two enzymes related to the glutathione S-transferase family (Z1 and GST-DHAR2) were over-represented by VNT4, especially at dose 2 (Tables IV.B.3 and 4, respectively). GSTs have been associated with defence against pathogens and xenobiotics in wheat (Mauch and Dudler, 1993). Altogether, the results indicated that VNT1 and VNT4 are able to stimulate specific enzymes related to the alleviation of oxidative stress in plants.

III.5 Proteins involved in C and N metabolism related to wheat grain quality traits are strongly affected by Glutacetine®-based formulations

Supply of Glutacetine®-based formulations changed the abundance of 27 proteins associated with C and N metabolism that are also linked to seed quality (Figure IV.B.3E). Indeed, Glutacetine®, VNT1, and VNT4 induced a differential expression of 1, 7 and 22 proteins, respectively (Figure IV.B.3E). Regarding flour quality, starch accumulation during grain filling is an essential process affecting the nutritional and technological quality of wheat grain (Daba et al., 2020). Glycogenesis and starch synthesis are thus important to ensure flour

Table IV.B.4 : (continued)

Accession	Protein name **Arabidopsis thaliana* name	Significance	Control	Group ratios VNT4-D1	VNT4-D2	VNT4-D3
A0A3B6B1Y1_WHEAT	Glutamate dehydrogenase	19.17	1	1.48	1.57	1.34
A0A3B6AYT7_WHEAT	40S ribosomal protein S8	16.49	1	1.68	1.54	1.34
A0A3B6HQ62_WHEAT	40S ribosomal protein SA	19.11	1	1.51	1.58	1.37
A0A3B6JHH9_WHEAT	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	20.99	1	1.38	1.62	1.38
A0A3B6ELF5_WHEAT	S5 DRBM domain-containing protein	15.13	1	1.97	1.6	1.38
A0A3B6FIG1_WHEAT	Aminotran_1_2 domain-containing protein	34.57	1	1.67	1.52	1.38
A0A3B6KMY1_WHEAT	Glyco_hydro_18 domain-containing protein	17	1	1.59	1.71	1.38
A0A3B6CFK7_WHEAT	5'-3' exoribonuclease 4*	16.67	1	1.64	1.65	1.39
A0A3B6KSW7_WHEAT	Leuk-A4-hydro_C domain-containing protein	19.77	1	1.4	1.55	1.39
A0A3B6NQF0_WHEAT	Aminopeptidase	15.32	1	1.47	1.61	1.42
A0A3B5Z289_WHEAT	Phosphotransferase	17.57	1	1.49	1.58	1.44
A0A3B6DCS5_WHEAT	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein	20.47	1	1.44	1.51	1.45
A0A3B6PKQ3_WHEAT	Acetolactate synthase small subunit 2, chloroplastic*	22.88	1	1.52	1.98	1.45
A0A3B5YWZ3_WHEAT	40S ribosomal protein S17-4*	22.24	1	1.77	1.86	1.45
A0A3B6B3A4_WHEAT	Coproporphyrinogen-III oxidase 1, chloroplastic *	25.32	1	1.29	1.53	1.46
A0A3B5ZPI1_WHEAT	Nitrogen regulatory protein P-II homolog*	20.7	1	1.74	1.55	1.47
W5G0E6_WHEAT	Proteasome subunit alpha type	23.07	1	1.64	1.96	1.51
A0A3B5ZS73_WHEAT	Arginine--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial*	22.26	1	1.55	2.03	1.52
A0A3B6IV90_WHEAT	CN hydrolase domain-containing protein	26.68	1	1.5	1.78	1.52
A0A3B6KJA2_WHEAT	Formate--tetrahydrofolate ligase*	15.26	1	1.62	1.54	1.53
A0A3B6DD91_WHEAT	Ribosomal_L18_c domain-containing protein	20.64	1	1.54	1.95	1.53
IF4E3_WHEAT	Eukaryotic translation initiation factor NCBP	33.4	1	1.8	1.83	1.53
A0A3B6N012_WHEAT	Diphosphomevalonate decarboxylase	15.43	1	1.62	1.47	1.54
A0A1D5W7I4_WHEAT	Ribosomal protein	20.62	1	1.64	1.82	1.56
W5H631_WHEAT	60S ribosomal protein L27	24.69	1	1.88	1.88	1.57
Q8L806_WHEAT	Putative ribosomal protein S18	19.15	1	2.1	2.04	1.61
A0A3B6MLB1_WHEAT	Hcy-binding domain-containing protein	31.6	1	1.33	1.49	1.63
A0A3B6FX27_WHEAT	Phosphotransferase	20.84	1	1.55	2.35	1.67
A0A3B6QML0_WHEAT	Aspartic proteinase A1*	17.42	1	1.24	1.54	1.68
A0A3B6PM29_WHEAT	Vacuolar-processing enzyme beta-isozyme*	28.15	1	2.42	2.71	1.68
A0A3B6TER0_WHEAT	IU_nuc_hydro domain-containing protein	26.3	1	1.7	1.78	1.77
W5FEV1_WHEAT	60S ribosomal protein L7-2*	16.46	1	2.28	2.48	1.82
A0A3B6AVD3_WHEAT	Small nuclear ribonucleoprotein G	21.66	1	1.79	1.69	2.06
A0A3B6B424_WHEAT	60S ribosomal protein L7-4*	17.91	1	2.45	2.79	2.08
W4ZRU3_WHEAT	Ribosomal_L7Ae domain-containing protein	19.41	1	1.43	1.9	2.97

quality for industry. In the present study, several proteins involved in sugar synthesis were over-represented in the VNT1 and VNT4 treatments. One of the most important is starch synthase (chloroplastic/amyloplastic), which is involved in the starch biosynthesis pathway (Ahuja et al., 2014); VNT1 (Table IV.B.2) and VNT4 (Table IV.B.3) strongly increased the abundance of this protein by up to 78% (for dose 3 of VNT4) compared to the control. Other enzymes catalysing reactions of the carbohydrate metabolic process were also over-represented in response to Glutacetine®-based formulations. First, the applications of Glutacetine® (Figure IV.B.4) and VNT4 (all doses, Table IV.B.4) led to increased abundance of phosphotransferase, a major regulator of cellular glucose homeostasis and the hexose metabolic process. Additionally, the abundance of UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase was improved by the 3 doses with VNT4 (Table IV.B.4). This enzyme plays a central role as a glucosyl donor in cellular metabolic pathways to produce UDP-glucose. Similarly, VNT4 increased the abundance of the FBPase domain-containing protein (Table IV.B.3), which is also involved in carbohydrate metabolism. In gluconeogenesis, the reaction catalysed by phosphoglycerate kinases generates adenosine diphosphate and 1,3-bisphosphoglycerate (Rosa-Téllez et al., 2018); this enzyme was reduced following dose 1, whereas it increased following doses 2 and 3 (Table IV.B.3). Moreover, irrespective of the dose, VNT4 increased the abundance of triose phosphate isomerase (Table IV.B.4), which is a housekeeping enzyme essential for glycogenesis and glycolysis where it catalyses the interconversion of glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate (Alber et al., 1987; Dumont et al., 2016). Sugars may also be stored in the cell walls. NAD(P)-bd_dom domain-containing protein (Table IV.B.2) is an enzyme that catalyses the formation of UDP-xylose and induces sugar storage in wheat seeds (Moriarity et al., 2002). In the same way, the abundance of UDP-arabinopyranose mutase 5, an enzyme connected with the biosynthesis of non-cellulosic polysaccharides in cell walls (Honta et al., 2018), was improved by VNT4, irrespective of the dose (Table IV.B.4). In addition, the abundance of glyco_hydro_18 domain-containing protein increased by VNT4 with all doses (Table IV.B.4). This enzyme belongs to the glycoside hydrolases, which have been shown to play unique roles in various biological processes like the biosynthesis of glycans, plant defence and the mobilization of storage reserves (Lammens et al., 2009). Thus, VNT1 and particularly VNT4 may improve sugar biosynthesis through induction of key enzymes of the carbohydrate pathway, mainly related

to glucose synthesis leading to starch accumulation during grain filling. This result may explain the better grain yield previously observed by Maignan et al. (2020) with these biostimulants.

Proteins related to N metabolism and synthesis of GSP were also strongly affected by Glutacetine®-based formulations. Among the over-represented proteins in VNT1, there were proteins important for AA metabolism such as glutamine synthetase (Table IV.B.2). Further, phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase (Table IV.B.2) is a key enzyme that promotes synthesis of 7-phospho-2-dehydro-3-deoxy-D-arabino-heptonate, which is a metabolite of the shikimate pathway of aromatic AA production (phenylalanine, tyrosine, and tryptophan) (Maeda and Dudareva, 2012). In wheat plants, the accumulation of AAs such as glutamine increases grain yield and protein synthesis (Hu et al., 2018). These observations are in agreement with the effect of biochar on wheat under saline soil (Sun et al., 2019). Moreover, in response to VNT4 treatment at all doses, the abundance of phosphoserine aminotransferase clearly increased (Table IV.B.4). This enzyme is part of the phosphorylated pathway of serine biosynthesis (Sekula et al., 2018) and serine is also a precursor of glycine, tryptophan, and cysteine. Thus, the over-representation of this enzyme following VNT4 application could induce the production of AAs during grain filing or seed germination in order to ensure protein synthesis. Very interestingly, glutamate dehydrogenase, which was also over-represented in all VNT4 treatments, catalyses ammonium incorporation into glutamate, and contributes to proline accumulation in leaves of wheat seedlings submitted to salt stress (Wang et al., 2007). Furthermore, molybdopterin molybdenum transferase, which was overexpressed with VNT1 (Table IV.B.1), is part of the molybdopterin biosynthesis pathway and is essential to cofactor biosynthesis during N metabolism. Stimulation of these proteins may induce N uptake and accumulation necessary for plant growth. Moreover, as previously described, all proteins connected with the translation process such as ribosomal proteins also contribute to protein synthesis. Overall, these proteins determine efficient N metabolism and protein biosynthesis.

N, AAs and N metabolites must be transported into the appropriate cell compartment or organ. As reported above, VNT4 increased the abundance of isocitrate dehydrogenase (regardless of the dose, Table IV.B.4), an enzyme that catalyses the production of α-ketoglutaric acid, which is one of the substrates of glutamine oxoglutarate aminotransferase (GOGAT). Interestingly, application of VNT4 differentially affected the abundance of ureide

permease depending on the dose: doses 1 and 3 reduced the amount of ureide permease, while dose 2 (the highest with 24.9 L ha^{-1}, Figure IV.B.1) increased it (Table IV.B.3). Ureide permease may connect cell compartments involved in ureide metabolism *via* a vesicle transport function (Lescano et al., 2020). As recently reported for the grain of bread wheat by Casartelli et al. (2019), allantoin (a ureide with four atoms of N that is an intermediate of purine degradation) may represent a major form of N storage comparable to other AAs like glutamine, aspartate, asparagine or arginine. The same authors also demonstrated that allantoin is a key target metabolite for improving N homeostasis and N-use efficiency in bread wheat subjected to stresses such as drought and N deficiency. Indeed, accumulation of this N-rich molecule under drought would contribute to optimizing the N (and C) balance in the plant by preventing toxic build-up of NH_4^+ and possible N losses through volatile ammonia due to reduced activity of the GS-GOGAT cycle (Casartelli et al., 2019).

Improving N homeostasis and AA synthesis also impact seed protein quality. GSPs are the most important proteins for technological performance and wheat quality, and GSP accumulation depends on regulatory proteins. In our proteomics study it seemed that Glutacetine® increased the abundance of peptidase, which might induce changes in the wheat gluten network (Verbauwhede et al., 2019). In response to VNT1 treatment, the reduced abundance of avenin-like b11 (Table IV.B.1) and the AAI domain-containing protein (Table IV.B.2, an avenin-like a4 protein) has important technological effects (Ma et al., 2013), but these proteins are also linked to celiac disease (Mujico et al., 2011). VNT1 also reduced the abundance of lipoxygenase (Table IV.B.2), which has effects on the rheological characteristics of wheat flour dough and bread making quality, especially in terms of reducing water absorption and dough stability. In fact, the addition of lipoxygenase in wheat flour produces softer bread with a lower firmness value (Bahal et al., 2013). Furthermore, increase sulfhydryl oxidase (Table IV.B.1) activity enhances the effects of ascorbic acid in wheat dough by stabilizing the structure of fresh and frozen dough (Faccio et al., 2012).

During grain development, prolamins are assembled in the endoplasmic reticulum and the enzyme disulfide isomerase catalyses disulfide bond formation, affecting the functional properties of gluten (Kim et al., 1988; Shewry and Tatham, 1997). Indeed, GSP families differ in the proportions of cysteine and methionine residues that they contain and are thus classified as being S-rich or S-poor protein. This is why the ratios between different GSP

families are associated with dough rheological properties and bread making quality (Dhaka and Khatkar, 2015; Li et al., 2020). In our study, VNT4 strongly affected gluten protein components relative to the control. The gliadin protein family (eight different proteins involved in celiac disease including avenin-like proteins) was substantially under-represented in the VNT4 treatment irrespective of the dose (maximum fold change: 0.11/1, Table IV.B.3 and 4). In contrast, the only glutenin (HMW-GS) fraction that was differentially represented under VNT4 was over-represented (maximum fold change: 1.54/1, Table IV.B.3), and this protein family is considered to have impacts on bread-making quality (Barro et al., 1997). Moreover, since HMW-GS and LMW-GS are respectively over-represented and not affected by VNT4, the HMW-GS/LMW-GS ratio increased, which is linked to a better technological performance (Dhaka and Khatkar, 2015). In agreement with our previous results (Maignan et al., 2020), it seems that the gliadin-to-glutenin ratio was decreased by this formulation. An earlier study reported that the gliadin/glutenin ratio showed a significant negative relationship to specific loaf volume, dough development time and dough stability (Dhaka and Khatkar, 2015), suggesting that VNT4 may contribute towards improving these three parameters. In the same way, when the gliadin/glutenin ratio decreased, the peak and final viscosities and the setback value initially increased (Li et al., 2020). Moreover, when N supplies increase, HMW-GS are able to store N (Altenbach et al., 2011). Thus, the over expression of this HMW-GS may be associated with the need to store N and therefore the amount of N in grains increased, as observed before (Maignan et al., 2020). Finally, the reduction in the amount of gliadins in flour is better for people with celiac disease (Daly et al., 2020; García-Molina et al., 2016; Mujico et al., 2011). Moreover, a Bowman-Birk-type trypsin inhibitor, which was over-represented with VNT4 (Table IV.B.3), causes specific and potent inhibition of trypsin- and chymotrypsin-like proteases and is currently being investigated as a colorectal chemopreventive agent because it could prevent or suppress carcinogenic and inflammatory processes within the gastrointestinal tract (Clemente and Arques, 2014).

IV. Conclusions

These results highlighted the effect of Glutacetine®-derived formulations on the main cellular processes that are associated with translational machinery regulation, defence responses against abiotic and biotic stresses, starch synthesis, protein accumulation and protease activity during grain development and maturation. To investigate the changes in

protein composition of wheat grain after Glutacetine®, VNT1 and VNT4 treatments of the plant, we performed a comparative total proteome analysis of the flour from milled grains of bread wheat. The protein composition in the grains was significantly changed with 131 proteins that were differentially accumulated after biostimulant treatments, including 11 proteins in common among the different biostimulant treatments.

This study also provides clues about the effects of Glutacetine®-derived biostimulants on the protein quality of bread wheat grain. Among the GSPs, alpha-gliadins were particularly differentially represented with VNT4 strongly affecting the functional characteristics of wheat flour dough while reducing the immunogenic properties of wheat that trigger celiac disease. Five proteins were also particularly interesting: i) avenin-like b11, which is a GSP that was substantially under-represented in the VNT1 and VNT4 treatments, is implicated in technological properties and celiac disease; ii) starch synthase, which was over-represented in the VNT1 and VNT4 treatments, is involved in starch accumulation during grain filling; iii) chitin-binding protein, which was over-represented by Glutacetine® and VNT1, is associated with plant defence mechanisms against biotic stress; iv) heat shock 70 kDa protein 1, which was over-represented in the VNT4 treatment, plays a role in alleviating oxidative stress related to abiotic constraints; and v) patellin protein, which was over-represented with VNT1, participates in hormonal pathways (especially auxin) and may support early stages of seedling development.

Author contributions

VM, J-CA, and PG designed the experiments. VM and J-CA conducted all the experiments, analysed the data and wrote the paper. BB performed the proteomic analysis. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding sources

The authors are grateful to the ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie), which has supported this work as part of a PhD thesis (CIFRE 2017/1239).

Acknowledgments

The authors deeply thank Vincent Allard for his involvement in this work and his valuable advice. The authors acknowledge Anne-Françoise Ameline, Patrick Beauclair, Magali Bodereau, Josiane Pichon and Olivier Rose for helping with plant culture and harvesting. The authors thank Julien Pontin for technical assistance with the proteomic analyses (Proteogen). We are most grateful to Laurence Cantrill for improving and correction of the English in the manuscript.

C. L'application de Glutacétine® sur le blé cultivé dans des conditions contrastées de plein champ améliore les performances agronomiques (nombre de grains, rendement et composantes liées à l'EUA) et modifie le ionome du grain

***Plants,* 2021, https://doi.org/10.3390/plants10030456**

Contexte : Le blé tendre d'hiver est l'une des plantes les plus cultivées au monde. Afin d'obtenir des rendements élevés, le blé est fertilisé avec une quantité importante d'azote. Malgré une forte efficience de remobilisation de l'azote, le blé présente une faible efficience d'usage de l'azote (EUA) qui limite sa productivité et peut conduire à diverses pollutions. Compte-tenu des résultats obtenus en conditions contrôlées montrant que la pulvérisation de Glutacétine® augmente le nombre de grains par épi, l'absorption post-épiaison, l'efficience de remobilisation de l'azote des racines et l'indice de récolte en azote, des expérimentations ont été conduites au champ afin d'évaluer les effets d'un apport de Glutacétine® seule en foliaire sur les performances agronomiques du blé tendre cultivé dans des conditions pédoclimatiques contrastées.

Objectif : Cette étude réalisée en condition de plein champ a pour but d'évaluer l'impact de la pulvérisation de Glutacétine® sur les performances agronomiques, l'EUA et la qualité des grains de blé (*Triticum aestivum* L.) ayant reçu une fertilisation optimale en urée ou en solution azotée.

Démarche expérimentale : Les plantes ont été cultivées sur trois sites ayant des caractéristiques pédoclimatiques contrastées en Normandie. La fertilisation azotée a été pilotée selon la méthode du bilan et le coefficient « bq » afin d'apporter une dose optimale d'urée ou de solution azotée. La Glutacétine® a été pulvérisée à la dose 5 L ha^{-1} au stade dernière feuille étalée. Les graines et la paille ont été récoltées à maturité.

Principaux résultats : Ces travaux montrent que l'application de Glutacétine® augmente significativement le nombre de grains par épi et par mètre carré quel que soit le site et la forme d'azote apportée. De plus, une forte tendance à améliorer le PMG (significatif avec une fertilisation uréique et sur le site 3), le rendement et l'EUA a été constatée suite à la pulvérisation de Glutacétine®. L'effet sur le site 3 est principalement associé au prolongement de la durée de vie des feuilles drapeaux. Par ailleurs, l'apport de Glutacétine® a induit des changements au niveau du ionome de la farine avec notamment l'augmentation de la teneur en Mn sur le site 3 fertilisé en solution azotée.

C. Glutacetine® biostimulant applied on wheat under contrasting field conditions improves grain number leading to better yield, upgrades N-related traits and changes grain ionome

Victor Maignan [1,2], Patrick Géliot [2] and Jean-Christophe Avice [1]

[1] Normandie Univ, UNICAEN, INRAE, UMR EVA, SFR Normandie Végétal FED4277, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen, France

[2] Via Végétale, 44430 Le Loroux-Bottereau, France

Keywords: plant biostimulants; nitrogen fertilizer; *Triticum aestivum*; nitrogen use efficiency; ionome; grain quality; SPAD-502®; X-ray fluorescence

Abstract

Wheat is one of the most important cereals for human nutrition, but nitrogen (N) losses during its cultivation cause economic problems and environmental risks. In order to improve N use efficiency (NUE), biostimulants are increasingly used. The present study aimed to evaluate the effects of Glutacetine®, a biostimulant sprayed at 5 L ha^{-1} in combination with fertilizers (urea or urea ammonium nitrate (UAN)), on N-related traits, grain yield components, and the grain quality of winter bread wheat grown at three field sites in Normandy (France). Glutacetine® improved grain yield *via* a significant increase in the grain number per spike and per m^2, which also enhanced the thousand grain weight, especially with urea. The total N in grains and the NUE tended to increase in response to Glutacetine®, irrespective of the site or the form of N fertilizer. Depending on the site, spraying Glutacetine® can also induce changes in the grain ionome (analyzed by X-ray fluorescence), with a reduction in P content observed (site 2 under urea nutrition) or an increase in Mn content (site 3 under UAN nutrition). These results provide a roadmap for utilizing Glutacetine® biostimulant to enhance wheat production and flour quality in a temperate climate.

I. Introduction

Chemical fertilizers, especially nitrogen (N), are one of the main inputs for boosting yield, but also one of the most expensive inputs in terms of economic costs and environmental risks. Many crops require large amounts of this element to maximize yield (Makino, 2011; Pan et al., 2020), but the use of N fertilizers is implicated in damage to the environment and human

health. The main environmental impacts of N are in the contamination of surface and groundwater resources and greenhouse gas emissions (Krol et al., 2020; Lassaletta et al., 2014; Ramanantenasoa et al., 2019). In terms of human health, the effects depend on the accumulation of nitrate in plant tissue; when nitrate is reduced to nitrite in the human body, it can cause methemoglobinemia, which is dangerous for young children (Aires et al., 2013). Nitrite can also react with several chemical compounds (amines and amides), producing N-nitrous compounds, suspected as probable carcinogens in humans (Santamaria, 2006).

For these reasons, it is necessary to choose the appropriate chemical form and the correct dose and application time to better manage N fertilizer application. These practices contribute to improvements in N use efficiency (NUE), which is linked to the capacity of plants to take up, transport, store and recycle N (Habbib et al., 2017; Hawkesford, 2017; Hirel et al., 2011; Xu et al., 2012). NUE is in general expressed as the harvestable yield per N supply (Moll et al., 1982). Approaches for improving NUE are mainly based on biotechnology and plant breeding, as well as chemical molecules such as N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NPBT) and 3,4-dimethypyrazole phosphate (DMPP) (Abalos et al., 2014; Castellano-Hinojosa et al., 2019; Huf and Olfs, 2020; Recio et al., 2018), which are urease and nitrification inhibitors, respectively. However, these inhibitors may affect the activities of soil microorganisms (Castellano-Hinojosa et al., 2019; Guardia et al., 2018) and also have negative impacts on plant metabolism (Artola et al., 2011; Zanin et al., 2016) and human health. This is why it is necessary to find alternatives that are environmentally friendly, such as treatment with plant biostimulants (Rouphael and Colla, 2020).

According to the EU regulation 2019/1009, “a plant biostimulant is a product that stimulates plant nutrition processes independently of the product’s nutrient content with the sole aim of improving one or more of the following characteristics of the plant or the plant rhizosphere: (a) nutrient use efficiency; (b) tolerance to abiotic stress; (c) quality traits; and (d) availability of confined nutrients in the soil or rhizosphere”. Plant biostimulants are defined more by the plant response they elicit than by their composition (Colla and Rouphael, 2015). They can influence phenotypic traits and improve yield by enhancing crop stress tolerance and nutrient uptake and assimilation. Therefore, bioactive substances (humic acids, protein hydrolysates, amino acids, seaweed extracts, etc.) and microorganisms (mycorrhizal fungi, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), etc.) are gaining ground in agricultural systems

Supplementary Table IV.C.1 : Location, wheat cultivars and soil properties of the three field trials.

	Site 1	Site 2	Site 3
Location	49.26491, -0.87763	49.512660, 0.409829	48.851115, 0.023732
Previous crop	*Beta vulgaris*	*Linum usitatissimum*	*Medicago sativa*
Wheat cultivar	Sacramento	Libravo	Chevignon
Sowing date	17-11-2018	16/10/2018	16-10-2018
Organic matter input	Yes	No	No
Soil type	Clay loams / Frank loams	Deep silt	Superficial clay limestone
pH (water)	6.2	7.3	8.4
CEC (mol kg^{-1})	9.5	8.5	10.8
Organic matter (%)	2.4	2.1	3.4
C/N Ratio	Not determined	8.1	7.6
Total N (%)	Not determined	0.15	0.26
Organic C (%)	1.42	1.22	1.98
Available P (ppm)	132	101	62
Exchangeable K (ppm)	168	238	254
Exchangeable Mg (ppm)	104	99	216
CaO (‰)	2.1	3.6	12.3

because of their potential to improve nutrient use efficiency. Previous studies have documented that the application of plant biostimulants improves leaf pigmentation and photosynthetic efficiency and triggers several molecular and physiological processes that induce an improvement in NUE, yield and quality (Carillo et al., 2019; Di Mola et al., 2019; Khan et al., 2019; Rouphael et al., 2020). The capacity of biostimulants to improve NUE is the main reason for their adoption across the agricultural sector, considering their economic and environmental advantages (Rouphael and Colla, 2018). These products can therefore be used to complement fertilizers in order to reduce inputs and increase NUE (Calvo et al., 2014) in crops such as winter wheat.

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important cereal crops. Winter wheat cultivars are commonly grown in France due to their good adaptation to the oceanic temperate climate. The grain yield values of 7 t ha^{-1} (Brisson et al., 2010) are among the highest in the world and France is the fifth largest producer globally (FAOSTAT). It is well documented that biostimulants are able to improve wheat productivity and quality. For example, the application of fulvic acid extracts improved soil properties and enhanced the growth, yield and nutritional status of wheat grown on contrasting soil types in China (Sootahar et al., 2020). In the same region, the application of different kinds of biostimulants alongside zinc (Zn) increased Zn concentrations and bioavailability in wheat grain (Wang et al., 2020). Research from India (Yadav et al., 2020) that aimed to increase micronutrient concentrations in wheat grains so that human dietary requirements can be met has reported increased wheat yields and biofortification following interactions between bacteria from native soil and arbuscular mycorrhizal fungi. In Iran, fluorescent *Pseudomonas* has been shown to enhance phosphorus (P) uptake (+42%) and grain yield (+17%) under water-deficit stress (Karimzadeh et al., 2020). In the European context, recent field studies in Poland have demonstrated the effect of silicon (Si) on the growth of spring wheat (Kowalska et al., 2020), and additions of protein hydrolysate have improved yield and grain quality of winter wheat (Popko et al., 2018). Closer to French weather conditions, *Bacillus* strains applied to winter wheat in Belgium improved wheat performance under different N supplies (Nguyen et al., 2019), and in France itself, marine and fungal biostimulants have led to increased grain yields (+1.8 to +5.5%) in durum wheat (Laurent et al., 2020). However, there have been few studies conducted in France and other temperate climate regions on the effects of biostimulant

Table IV.C.1 : Effects of site (S), form of N nutrition (F: urea or urea-ammonium-nitrate (UAN)) and/or biostimulant treatment (T: Glutacetine®) on grain yield, yield components and N-related traits determined by three-way analysis of variance (Global ANOVA) and two-way ANOVA (for each form of N fertilizer).

		Grain yield and its components						N-related traits						
		Yield t/ha	Spikes /m²	Grains /spike	Grains /m²	TGW	Specific Weight	%N in grain	%N in straw	Total grain N	NUE	%N in the flag leaf at heading	%N in the flag leaf during seed development	Δ%N in the flag leaf
Global ANOVA	Site (S)	***	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***	*	***
	Fertilizer (F)							***		**				
	Treatment (T)	< 0.08	< 0.07	*	*	< 0.06					< 0.08			
	S x F													
	S x T													*
	F x T													
	S x F x T													
ANOVA Urea	Site	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***		***
	Treatment		*	*		*								
	S x T													< 0.08
ANOVA UAN	Site	**	**	*	***	***	***	***	***	***	***	***	< 0.08	***
	Treatment				*									
	S x T													

*, **, *** = significant at 0.05, 0.01 and 0.001, respectively, $p > F$ for n = 3. Δ%N in the flag leaf corresponds to the variation of %N in the flag leaf between heading and seed development (n = 9). NUE: Nitrogen Use Efficiency; TGW: Thousand Grain Weight.

application on bread wheat productivity. Moreover, the performance of such treatments is dependent not only on the date and the dose of the application, but also on the soil and weather conditions (Colla et al., 2017). To the best of our knowledge, there have not been any studies assessing the impact of an organo-mineral complex biostimulant, such as Glutacetine®, on the NUE, grain yield and quality of bread wheat under field conditions in temperate regions.

Regarding quality traits, plant biostimulants induce changes in wheat grain technological characteristics (Popko et al., 2018), the grain proteome (Maignan et al., 2020) and especially the grain ionome (Yadav et al., 2020). Aside from the presence of sufficient calories and proteins in the diet, another important trait is the micronutrient composition of food. Indeed, malnourishment may arise from micronutrient deficiency. According to the World Health Organization (2002), iron (Fe) and Zn are deficient in the diet of more than half of the world's population (Ciccolini et al., 2017; World Health Organization, 2002). Further, magnesium (Mg), and calcium (Ca) are also deficient in the diet of some of the population (Oury et al., 2006; White and Broadley, 2005). Although manganese (Mn) deficiency in humans is not a widespread global issue, this trace element also plays pivotal roles in growth and development as a cofactor or a component of several key enzyme systems (Cu et al., 2020). These micronutrient deficiencies have been amplified by a constant decline in mineral concentrations in grain over the last century, and have impacted the Fe, Zn (Ciccolini et al., 2017) and Mg composition at harvest (Oury et al., 2006). It has been postulated that this loss of harvest quality has been the result of varietal selection over the past 70 years that aimed to achieve higher yield under a sufficient macronutrient supply and despite sufficient micronutrient content in the soil (Bharti, 2018; Shewry et al., 2012). Fe, Zn, Ca, Mn and Mg are also of great importance for plant metabolism, especially for enzymes and regulatory proteins (Vanoni et al., 2005), and are also essential to signaling (Navazio et al., 2020; Thor, 2019), transport (Connorton et al., 2017; Evens et al., 2017; Pearce et al., 2014) and remobilization (Maillard et al., 2015; Waters et al., 2009). This means that both harvest quality and crop development can be limited by their lack of availability. Another problem that aggravates this situation is the presence of phytate in wheat grains, an antinutritional factor that forms complexes with minerals such as Ca, Mg, Zn and Fe, thus reducing their bioavailability in flour (Ficco et al., 2009; Gupta et al., 2020).

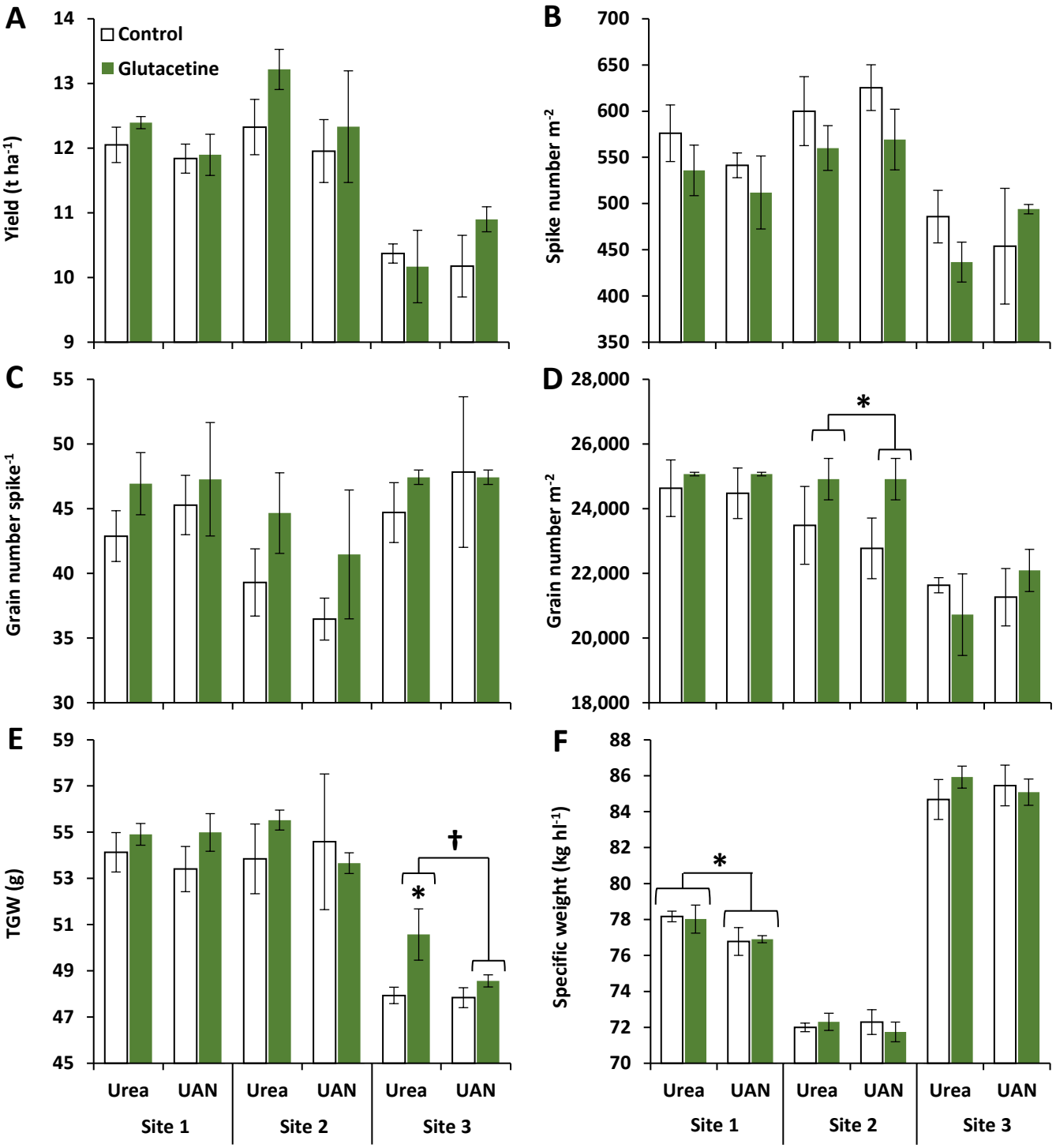


Figure VI.C.1 : Effect of the Glutacetine® formulation under urea or UAN nutrition on grain yield and yield parameters in wheat (*Triticum aestivum* L.). (A) Grain yield (t ha^{-1}), (B) spike number per square metre, (C) grain number per spike, (D) grain number per square metre, (E) thousand grain weight (TGW) and (F) specific weight (kg hl^{-1}). Plant culture was carried out under three different field conditions in France, Normandy. N was provided at tillering, stem elongation and the flag leaf stages. Glutacetine® was mixed with water and sprayed at a dose of 5 L ha^{-1} on the same day as the last N application. Bars indicate means ± SE. ∗ and † denote significant differences according to Fisher's test or Kruskal–Wallis test, respectively ($p < 0.05$; n = 3).

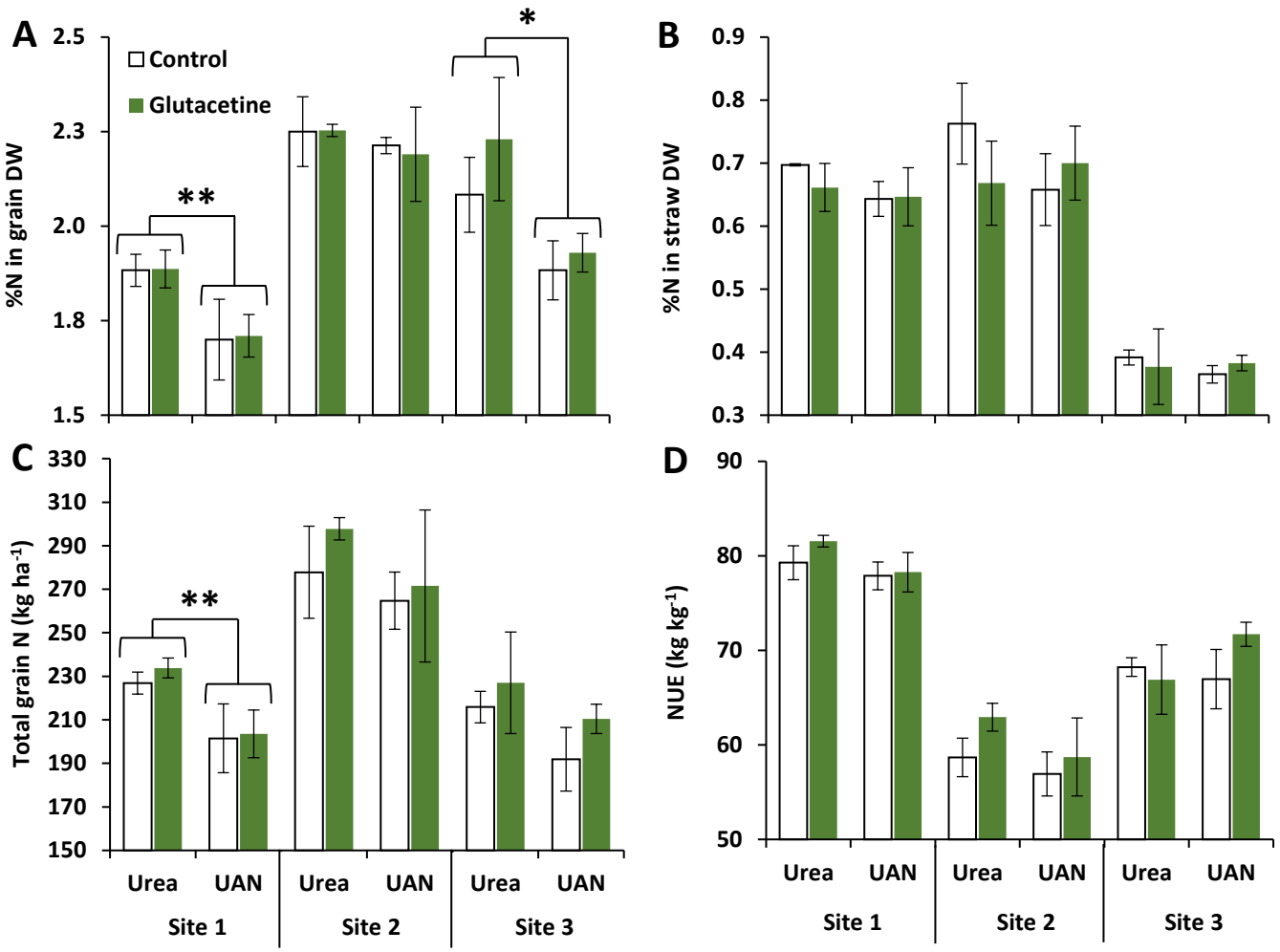
To prevent micronutrient deficiencies, wheat biofortification programs have been developed mainly for Zn (Khokhar et al., 2018; Paltridge et al., 2012; Rehman et al., 2018) and Fe (Ciccolini et al., 2017; Ramzani et al., 2016), but also for Mn (Qiao et al., 2019). Research in this domain tends to focus on either breeding selection or fertilizing practices. Research in plant breeding with the aim of increasing uptake and translocation towards the grain can take many years before new varieties are obtained for food production. Another strategy relies on the development of enhanced-efficiency fertilizers and biostimulants that are more efficient than traditional chemicals. Designing and developing new biostimulants or enhanced fertilizers is a crucial process that requires accurate testing of the product's effects on crop yield and quality traits and a deep understanding of their mechanism of action under field conditions.

The aim of this study was to assess the effect of foliar application of Glutacetine® on winter wheat grown under field conditions with different N fertilizer regimes (urea alone or urea-ammonium-nitrate solution (UAN)). Experiments were carried out in three different sites in Normandy (France) to evaluate the possible beneficial effects of this biostimulant on three different cultivars grown under optimal N conditions to determine its influence on NUE, yield and grain quality, as well as the grain and straw ionomes.

II. Results

II.1 Effects of site, N fertilizer forms and Glutacetine® on grain yield and its components

To better understand the impact of site (S), N fertilizer forms (F), the Glutacetine® treatment (T) and their interactions, a global analysis of variance (ANOVA) was first undertaken for grain yield and several yield components (spike number per square meter, grain number per spike, grain number per square meter, thousand grain weight (TGW) and specific weight). The global ANOVA presented in Table IV.C.1 shows a strong effect of field site on grain yield and yield components ($p < 0.01$), which was probably due to the contrasting pedoclimatic conditions and the different cultivars used (Supplementary Table IV.C.1). On the other hand, there was no effect of N fertilizer forms or S x F x T interactions on grain yield and its components (Table IV.C.1). Considering each of the N fertilizer forms (urea or UAN), the effect of site on grain yield and its components was confirmed by ANOVA, except for grain number per spike, which was not significant under urea nutrition (Table IV.C.1). Nevertheless,



<u>Figure IV.C.2</u> : Effect of Glutacetine® formulation under urea or UAN nutrition on N-related traits at maturity in wheat (*Triticum aestivum* L.). (A) %N in grain DW, (B) %N in straw DW, (C) total grain N (kg ha^{-1}) and (D) N use efficiency (NUE, kg kg^{-1}). Plant culture was carried out under three different field conditions in France, Normandy (otherwise, see Figure IV.C.1 for more details). Bars indicate means ± SE. ∗ denote significant differences according to Fisher's test (∗: $p < 0.05$; ∗∗: $p < 0.01$; n = 3).

we showed a fertilizer effect on the specific weight at site 1 ($p < 0.05$) due to a decrease in this parameter when wheat was fertilized with UAN (irrespective of the biostimulant treatment) compared to urea nutrition (Figure IV.C.1F, $p = 0.0139$).

Regarding biostimulant application (T), the global ANOVA indicated a significant effect of Glutacetine® on grain number per spike (+7.3%, $p = 0.045$, Table IV.C.1) and grain number per square meter (+3.3%, $p = 0.033$, Table IV.C.1), and a slight effect on other yield components: spike number per square meter ($p = 0.066$) and TGW ($p = 0.055$). Interestingly, with urea nutrition, we showed a significant treatment effect on spike number per square meter, grain number per spike and TGW ($p < 0.05$, Table IV.C.1), while it was significant for grain number per square meter under UAN fertilizer ($p = 0.030$, Table IV.C.1). Indeed, Glutacetine® decreased spike number per square meter and increased grain number per spike in all situations except under UAN nutrition at site 3 (Figures IV.C.1B and C), leading to a higher grain number per square meter (except under urea fertilizer at site 3), which was slightly significant under UAN nutrition at site 2 ($p = 0.082$, +9.4%, Figure IV.C.1D). This parameter was significantly increased by Glutacetine® at this site, irrespective of the N fertilizer forms (+7.7%, $p = 0.039$, Figure IV.C.1D). In the same way, TGW was slightly improved by Glutacetine® treatment at all sites (Figure IV.C.1E and Table IV.C.1). It was significantly higher at site 3 under urea nutrition (+5.5%, $p < 0.05$) and irrespective of the type of N fertilizer ($p < 0.05$, Figure IV.C.1E). However, Glutacetine® application did not induce consistent change in specific weight (Figure IV.C.1F). The amelioration of grain number per square meter (+751 g m^{-2}) and TGW (+2 g) after Glutacetine® application led to an improvement in grain yield ($p = 0.076$, Table IV.C.1) by 345 kg ha^{-1} under urea nutrition and by 387 kg ha^{-1} under UAN nutrition, while grain yield ranged from 10.17 to 13.22 t ha^{-1} over the three sites of experimentation (Figure IV.C.1A).

II.2 Impacts of site, N fertilizer forms and Glutacetine® on N-related traits

After the final harvest, global ANOVA revealed strong site and fertilizer effects ($p < 0.001$ for both) for N concentration in the grain (Table IV.C.1). The site effect was observed under both urea and UAN nutrition (Table IV.C.1), while the fertilizer effect was significant only at sites 1 and 3 (Figure IV.C.2A). Indeed, the N content in grain ranged from 1.70 (site 1) to 2.25% (site 2) and site 3 had intermediate values (Figure IV.C.2A). The fertilizer effect highlighted a better N content in the grain when urea was used compared to UAN at sites 1

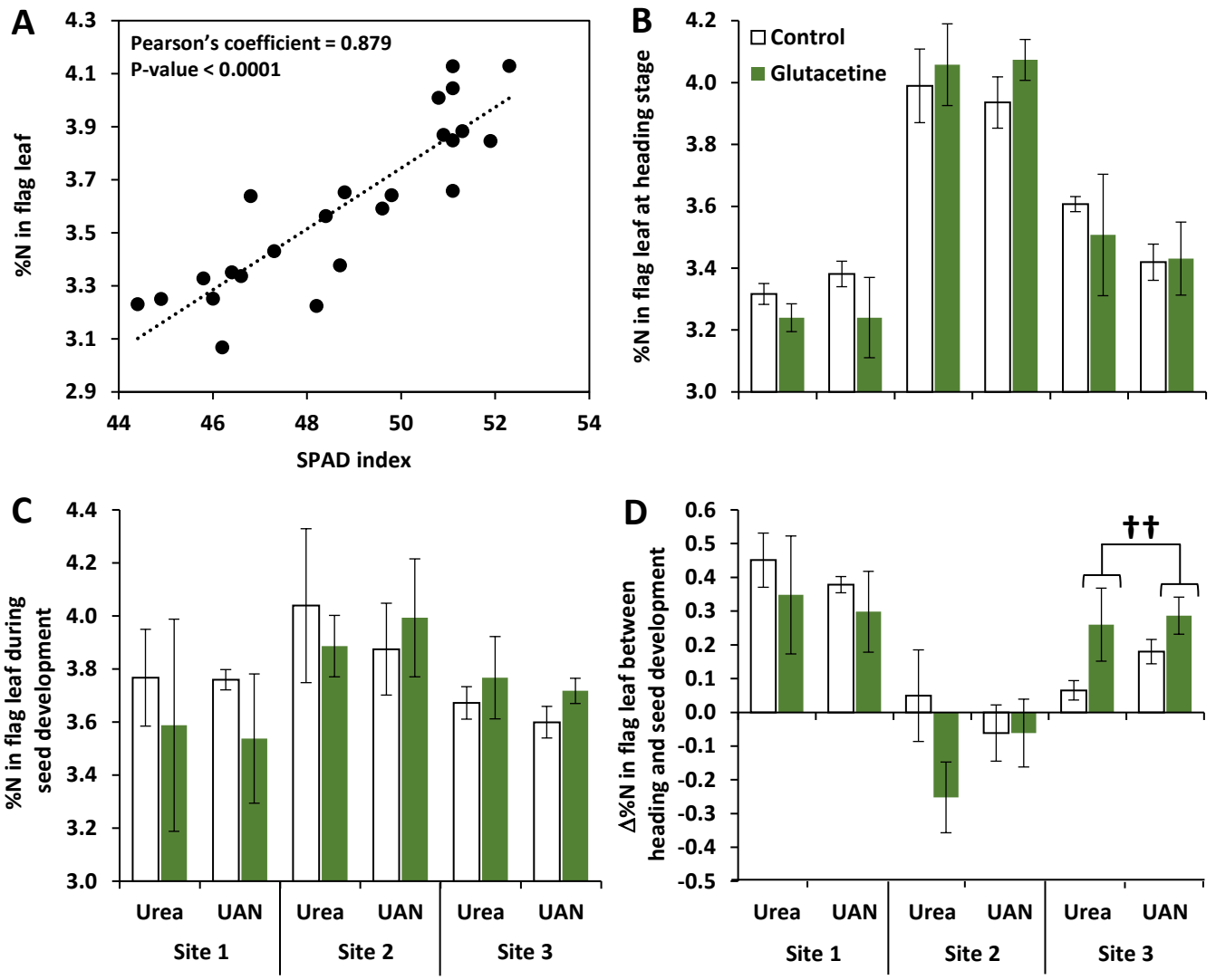


Figure IV.C.3 : SPAD index calibration and N-related traits associated with the flag leaf in wheat (*Triticum aestivum* L.). (A) Relationship between the SPAD index and %N in the flag leaf of wheat, (B) %N in the flag leaf at heading stage, (C) %N in the flag leaf during seed development and (D) the Δ%N in the flag leaf between heading and seed development stages of wheat. Plant culture was carried out under three different field conditions in France, Normandy (otherwise, see Figure IV.C.1 for more details). Bars indicate means ± SE. †† denote significant differences according to Kruskal–Wallis test ($p < 0.01$; n = 9 for the Δ%N in the flag leaf between heading and seed development stages).

(+10.6%, p = 0.005) and 3 (+13.1%, p = 0.015). Focusing on the effect of Glutacetine®, we did not observe consistent change in N concentration in the grain. Furthermore, the analysis of N content in straw also indicated an important site effect irrespective of the fertilizer used, while neither fertilizer nor biostimulant had an impact on this parameter (Table IV.C.1). In fact, site 3 presented much lower straw N concentrations than sites 1 and 2 (Figure IV.C.2B).

Moreover, the total grain N was determined to evaluate the amount of N exported to grains depending on the different field conditions. Regardless of the type of N fertilizer used (urea or UAN), ANOVA still indicated a site effect on total grain N (p < 0.001, Table IV.C.1). Compared to sites 1 and 3, more N was exported to grains of wheat at site 2 (+64 kgN ha^{-1}, p < 0.001, Figure IV.C.2C). There was also an effect from the type of fertilizer (p < 0.01), especially at site 1, highlighting the better efficiency of urea compared to UAN in exporting N to grains (Figure IV.C.2C). Even though global ANOVA did not reveal a significant effect of Glutacetine® on total grain N (p = 0.166), there was a strong tendency for this parameter to improve. Indeed, compared to control, total grain N was slightly increased by Glutacetine® (to 9.6%: +18.5 kgN ha^{-1} at site 3 under UAN nutrition), irrespective of the site and the N form (Figure IV.C.2C). These results were then supported by a calculation of NUE that also showed an important site effect regardless of the type of N fertilizer (p < 0.001, Table IV.C.1). NUE was significantly different at each site (p < 0.001 between them, Figure IV.C.2D): site 1 had the highest NUE, site 3 an intermediate NUE and site 2 the lowest, confirming the contrasting pedoclimatic, cultivar and N management conditions. As for total grain N, three-way ANOVA indicated that Glutacetine® slightly improved NUE (p = 0.077, Table IV.C.1 and Figure IV.C.2D). This means that for each kilogram of N applied, spraying Glutacetine® facilitated the production of an additional 2 kg of grain. In comparison to the control groups, it could be hypothesized that this improvement in total grain N was mainly due to a more efficient N uptake and/or utilization (i.e., assimilation and/or remobilization) after spraying Glutacetine®.

To address this question, the N status in leaves was studied in response to the biostimulant. In order to determine the leaf N status, measurement of the chlorophyll level (the SPAD index) was used as a means to estimate relative N content in the flag leaf. For that, the %N in the flag leaf was first determined by IRMS from a calibration curve at site 1. Relative N content in leaves was then correlated with the SPAD index and the correlations were assessed with Pearson's test. We showed a strong relationship between these two parameters

Table IV.C.2 : Effects of site (S), form of N fertilizer (F: urea or urea-ammonium-nitrate (UAN)) and/or biostimulant treatment (T: Glutacetine®) on the grain and straw ionomes determined by three-way analysis of variance (global ANOVA) and two-way ANOVA (for each form of N fertilizer).

		Grain ionome								Straw ionome				
		Ca	Fe	K	Mg	Mn	P	S	Zn	Ca	Fe	K	Mg	S
Global ANOVA	Site (S)	***	< 0.06	***				***	**	***	*	***		**
	Fertilizer (F)						*	*						
	Treatment (T)									< 0.06				
	S x F			*			< 0.08	*						
	S x T									*				
	F x T													
	S x F x T		< 0.08			**		*						
ANOVA Urea	Site	***		***			**	***	*	***	***	***		*
	Treatment										*	< 0.07		
	S x T					< 0.06								
ANOVA UAN	Site	***						***	< 0.06	***		***		< 0.06
	Treatment													
	S x T		< 0.08					< 0.06		*				

*, **, *** = significant at 0.05, 0.01 and 0.001, respectively, $p > F$ for n = 3.

(R^2 = 0.77, p < 0.0001, Figure IV.C.3A), which allowed us to calculate the relative N content in the flag leaf at the heading stage (BBCH51) and during seed development (BBCH71, Figure IV.C.3B and C). Irrespective of the fertilizer and the biostimulant treatment, three-way ANOVA (Table IV.C.1) indicated a site effect on the %N in the flag leaf at both stages. Indeed, at the heading stage, the flag leaf had a higher N content at site 2 compared to sites 1 and 3 (Figure IV.C.3B), suggesting that this flag leaf presents a higher activity in terms of photosynthesis. During seed development (Figure IV.C.3C), the %N in the flag leaf was also different depending on the site, but the ANOVA of urea nutrition (ANOVA Urea) did not show consistent change, whereas the ANOVA of UAN nutrition (ANOVA UAN) revealed a slight site effect (p = 0.076, Table IV.C.1). We then calculated the difference in variation in %N (Δ%N, Figure IV.C.3D) between the heading and seed development stages to assess whether plants continued to accumulate N in the flag leaf or whether they had commenced the remobilization process. Three-way ANOVA indicated a significant site effect (p < 0.001) on the Δ%N in the flag leaf irrespective of the fertilizer (Table IV.C.1). Indeed, Δ%N at site 2 resulted in negative values (meaning that N remobilization had started), while the values at sites 1 and 3 were positive (Figure IV.C.3D). Three-way ANOVA also revealed an S × T interaction (p < 0.05, Table IV.C.1), which was mainly due to the biostimulant effect at site 3 under both urea and UAN nutrition (p < 0.01, Figure IV.C.3D). Remarkably, with urea nutrition, there was a slight biostimulant effect (i) at site 2 (p = 0.081), which decreased more the Δ%N in the flag leaf compared to the control (-0.25% with Glutacetine® versus +0.05 for control, Figure IV.C.3D), and (ii) at site 3 (p = 0.058), which increased more than the Δ%N in the flag leaf compared to the control (0.27 with Glutacetine® instead of 0.12, Figure IV.C.3D), and maintained higher levels of chlorophyll and N in these leaves.

II.3 Effects of site, N fertilizer forms and Glutacetine® on the grain ionome

For the study of the grain ionome, we then measured elemental concentrations in wheat grain using X-ray fluorescence (XRF) calibrated with HR ICP-MS (Supplementary Figure IV.C.2). As a rapid and non-destructive method of elemental analysis, XRF allowed the detection and quantification of Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, S and Zn in grain. A site effect was observed for Ca (p < 0.001), Fe (p < 0.06), K (p < 0.001), S (p < 0.001) and Zn (p < 0.01) contents in wheat grain (three-way ANOVA, Table IV.C.2). Considering N fertilizer forms, the site effect was also significant for Ca, K, P, S and Zn under urea supply and for Ca and S under UAN

Table IV.C.3 : Effects of Glutacetine® on the grain ionome under contrasting field (sites 1, 2 and 3) and N fertilizer conditions (with urea or urea-ammonium-nitrate (UAN)). The relative content (expressed as ppm) of each element was determined by XRF and then calculated with ICP-MS calibration.

			P	K	S	Mg	Ca	Fe	Zn	Mn
Site 1	**Urea**	**Control**	2726 ± 63	5654 ± 73	1112 ± 10	1154 ± 45	616 ± 19.2	34.0 ± 5.6	37.7 ± 1.7	30.6 ± 2.8
		Glutacetine®	2826 ± 76	5665 ± 206	1105 ± 29	1278 ± 99	608 ± 10.1	26.8 ± 8.1	36.7 ± 1.4	38.7 ± 3.7
	UAN	**Control**	2527 ± 163 *	4824 ± 306 **	1083 ± 8	1273 ± 61	546 ± 24.0	29.3 ± 4.4	35.3 ± 4.2	34.9 ± 2.5
		Glutacetine®	2518 ± 153	5215 ± 127	1080 ± 37	1187 ± 12 †	608 ± 36.1	30.9 ± 1.4	38.6 ± 3.0	33.3 ± 1.8
Site 2	**Urea**	**Control**	2667 ± 18	4957 ± 114	1274 ± 19	1227 ± 76	677 ± 20.9	33.8 ± 2.9	34.8 ± 3.8	30.8 ± 1.6
		Glutacetine®	2541 ± 34 *	4899 ± 59	1240 ± 16	1118 ± 58	677 ± 14.5	30.8 ± 1.9	33.8 ± 2.7	31.7 ± 1.6
	UAN	**Control**	2659 ± 60	5337 ± 381	1259 ± 7	1264 ± 82	708 ± 22.1	32.2 ± 3.1	34.8 ± 1.7	31.3 ± 3.6
		Glutacetine®	2621 ± 143	5054 ± 313	1264 ± 2	1186 ± 29	681 ± 27.1	34.2 ± 2.5	32.8 ± 4.4	31.5 ± 2.1
Site 3	**Urea**	**Control**	2532 ± 100	5971 ± 326	1285 ± 30	1147 ± 49	829 ± 41.5	34.8 ± 3.9	40.8 ± 3.1	35.7 ± 3.5
		Glutacetine®	2595 ± 24	5858 ± 167	1316 ± 24	1192 ± 58	803 ± 37.8	37.3 ± 0.2	40.8 ± 3.4	32.0 ± 2.0
	UAN	**Control**	2369 ± 62	5650 ± 143	1267 ± 13	1216 ± 124	792 ± 9.4	39.7 ± 2.3	42.3 ± 2.2	30.8 ± 1.6
		Glutacetine®	2560 ± 184	5603 ± 465	1239 ± 10	1287 ± 83	778 ± 51.4	31.4 ± 1.9 *	39.1 ± 2.1	36.6 ± 1.3 *

Values indicate means ± SE. * and † denote significant differences according to Fisher's test or Kruskal–Wallis, respectively ($p < 0.05$; **: $p < 0.01$; n = 3).

fertilizer (two-way ANOVA, Table IV.C.2). Indeed, the Ca and S contents in the grain were the highest at site 3 and the lowest at site 1 (Table IV.C.3). Furthermore, we observed a fertilizer effect only for P and S contents (three-way ANOVA, Table IV.C.2). In fact, the fertilizer effect on P concentration was mainly observed at site 1 (UAN fertilizer reduced P content by 9.1% compared to urea, Table IV.C.3). This is why there were S × F interactions for P and S concentrations (p = 0.079 and p < 0.05, respectively, Table IV.C.2). A similar S × F interaction was observed for K content (p = 0.018), which was especially affected by the N form at site 1 (Table IV.C.2): urea treatment led to a higher K concentration in the grain compared to UAN (+12.7%, Table IV.C.3).

Focusing on Glutacetine® effects, three-way ANOVA revealed an S × F × T effect for Fe (p = 0.077), Mn (p < 0.01) and S (p < 0.05, Table IV.C.2). Considering UAN fertilizer, ANOVA UAN indicated a slight S x T effect on Fe (p = 0.073, Table IV.C.2) which was mainly due to the reduction in Fe content in the grain by Glutacetine® under UAN fertilizer at site 3 (−8.3 ppm, p = 0.027, Table IV.C.3). Regarding Mn content, there was an S × T interaction revealed in ANOVA Urea (p = 0.058), which was due to the significant increase in Mn content by 5.8 ppm after spraying Glutacetine® with UAN at site 3 (Table IV.C.3). In addition, under urea nutrition, Glutacetine® reduced P content at site 2 and we observed the same effect for Mg content at site 1 under UAN fertilizer (Table IV.C.3). These results demonstrated that the Glutacetine® biostimulant may change micronutrient concentrations in winter wheat grain under field conditions.

II.4 Effects of site, N fertilizer forms and Glutacetine® on the straw ionome

Alongside analysis of the grain, we used XRF for determination of Ca, Fe, K, Mg and S concentrations in wheat straw after calibration with HR ICP-MS (Supplementary Figure IV.C.3). Global ANOVA and ANOVA Urea showed a strong site effect for Ca, Fe, K and S (p < 0.05 minimum), while ANOVA UAN indicated a site effect for Ca and K (p < 0.001 for both) with a slight impact on S content (p = 0.058, Table IV.C.2). Indeed, the Ca and S contents ranged from their lowest values at site 1 to the highest at site 3 (Table IV.C.4). In the same way, the K concentration in straw was substantially different depending on the site (from 5700 ppm at site 3 to 15,712 ppm at site 2, Table IV.C.4). In contrast, the Fe concentration was higher at site 1 (157 ppm on average) compared to sites 2 (121 ppm on average) and 3 (116 ppm on

Table IV.C.4 : Effects of Glutacetine® on the straw ionome under contrasting field (sites 1, 2 and 3) and N fertilizer conditions (with urea or urea-ammonium-nitrate (UAN)). The relative content (expressed as ppm) of each element was determined by XRF and then calculated with ICP-MS calibration.

			K	Mg	S	Ca	Fe
Site 1	**Urea**	**Control**	10945 ± 632	937 ± 58.9	866 ± 24.3	2639 ± 53	152 ± 3.6
		Glutacetine®	11231 ± 315	895 ± 52.6	852 ± 33.3	2726 ± 106	135 ± 9.0
	UAN	**Control**	11008 ± 461	826 ± 113.1	897 ± 72.4	2664 ± 86	144 ± 18.1
		Glutacetine®	10062 ± 406	835 ± 123.6	918 ± 27.4	2638 ± 34	196 ± 21.9
Site 2	**Urea**	**Control**	14796 ± 480	829 ± 48.6	964 ± 25.5	3487 ± 125	111 ± 14.9
		Glutacetine®	15630 ± 1155	711 ± 141.9	1004 ± 41.0	3236 ± 201	78 ± 6.0
	UAN	**Control**	16132 ± 1990	714 ± 39.5	949 ± 72.0	3269 ± 189	132 ± 55.8
		Glutacetine®	16289 ± 1405	764 ± 76.7	971 ± 35.3	3394 ± 93	162 ± 71.1
Site 3	**Urea**	**Control**	4692 ± 785	686 ± 149.6	1008 ± 75.9	4845 ± 320	131 ± 14.7
		Glutacetine®	6946 ± 1168	858 ± 82.2	977 ± 102.0	4531 ± 139	119 ± 8.9
	UAN	**Control**	5862 ± 965	975 ± 111.3	1050 ± 93.7	5019 ± 24	∗ 116 ± 9.2
		Glutacetine®	5299 ± 431	791 ± 135.2	1034 ± 38.1	4534 ± 156 ∗	98 ± 1.5

Values indicate means ± SE. ∗ denote significant difference according to Fisher's test ($p < 0.05$; $n = 3$).

average, p = 0.014, Table IV.C.4). However, there was no consistent change regarding the effect of N fertilizer form.

Remarkably, there was a slight Glutacetine® effect (p = 0.053) and a significant S x T interaction (p < 0.05) for the Ca content in straw (Table IV.C.2). This observed S x T interaction (Table IV.C.2) was mainly due to the biostimulant effect at site 3, which significantly reduced the Ca concentration by -9.7% irrespective of the fertilizer (two-way ANOVA, p = 0.034, Table IV.C.4). ANOVA UAN also showed an S × T interaction for Ca (Table IV.C.2) because Glutacetine® significantly reduced Ca content at site 3 under UAN nutrition (-9.7%, p = 0.020, Table IV.C.4). Regarding urea fertilizer, a significant Glutacetine® effect on Fe content in straw was observed (two-way ANOVA, p = 0.012, Table IV.C.2), which tended to decrease after the application of the formulation (Table IV.C.4). Altogether, these results suggested that Glutacetine® initiated changes in the straw ionome, especially in terms of Ca and Fe content, and that this was dependent on the site and N management, which could have impacts on remobilization efficiency.

III. Discussion

The objectives of this study were to provide details about the effects of Glutacetine® on grain yield components, N-related traits and bread wheat grain quality under contrasting field conditions. Clearly, the present work highlighted the impacts of this biostimulant in combination with urea or UAN fertilizer applications on grain yield components, total grain N, NUE and especially the grain ionome.

III.1 Glutacetine® improves grain yield by increasing grain number per spike and per square meter

The present work was performed in three contrasting agro-pedoclimatic conditions and strong site effects on grain yield and its components were evident, regardless of the form of N nutrition (Table IV.C.1 and Figure IV.C.1). These different impacts were mainly related to soil type, cultivar and weather conditions (Supplementary Table IV.C.1 and Supplementary Figure IV.C.1).

According to the literature, nutrient accumulation and yield of winter wheat are impacted by N supply (Power and Alessi, 1978) and N fertilizer form (Wang and Below, 1995). In the present study, we confirmed that the N form influenced TGW (site 3) and specific weight (site 1) but did not affect grain yield in winter wheat (Table IV.C.1). As UAN is composed of

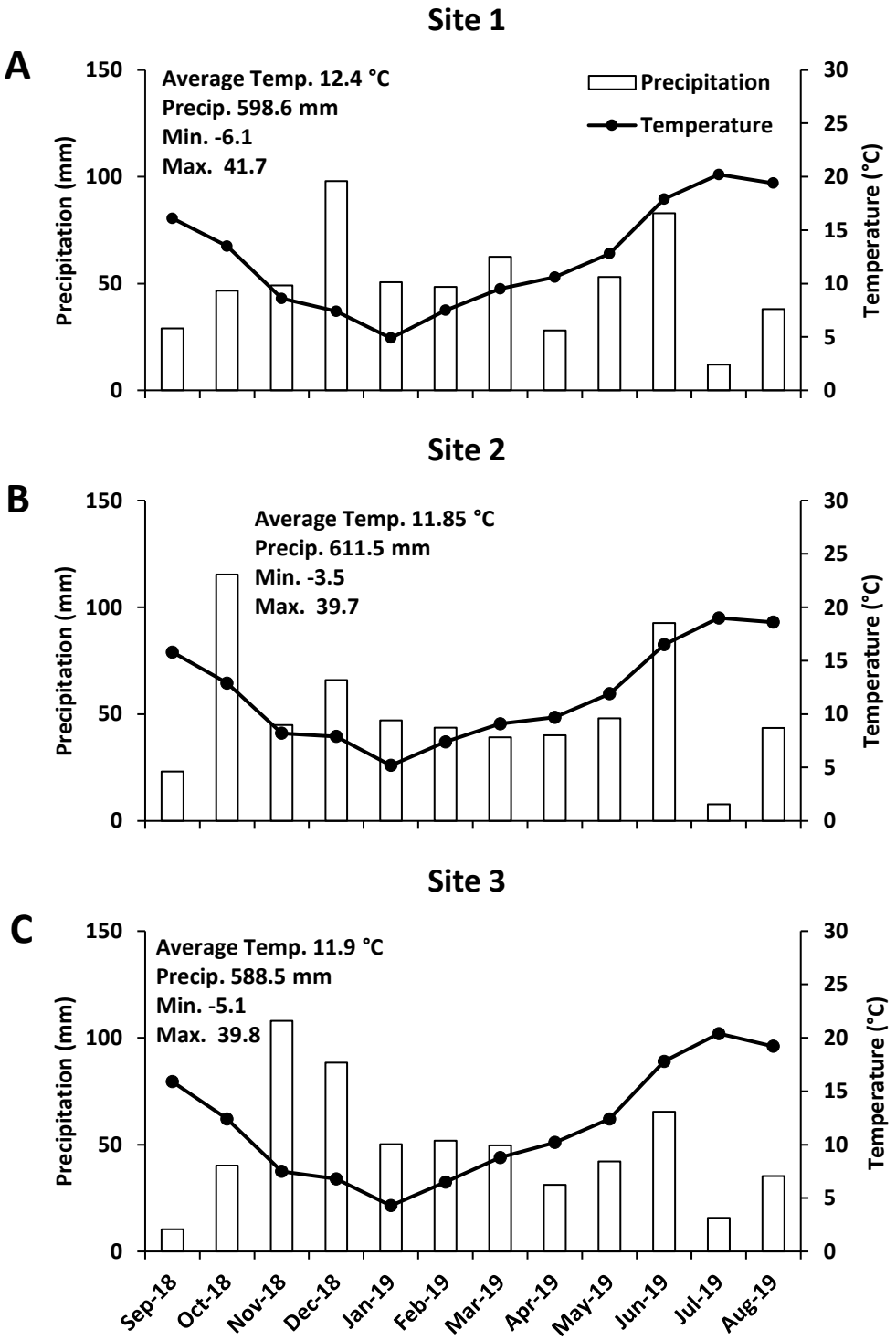
Supplementary Table IV.C.2 : Nitrogen management in the three field trials.

	Site 1	Site 2	Site 3
Humus effect	65	50	30
Previous crop effect	20	0	40
M.O. supply effect	12	0	0
N uptake	10	29	26
N residue (NO_3^-/NH_4^+)	33 (25/8)	35 (33/2)	42 (34/8)
Total N soil supply (kg N ha^{-1})	140	114	138
Crop needs	272	304	270
N remaining	20	20	20
Total N needs	292	324	290
N fertilizer	152	210	152
Supply 1 (Tillering, BBCH 21)	61	100	62
Supply 2 (Stem elongation, BBCH 31)	31	50	30
Supply 3 (Flag leaf extended, BBCH 39)	60	60	60

50% urea and the N supply was the same at each site, the different forms of fertilizer management were not sufficient to significantly change yield.

Considering the three field experiments together, Glutacetine® had a significant positive effect on grain number expressed per spike and per square meter (especially at site 2, Figure IV.C.1D), irrespective of the form of N fertilizer (Table IV.C.1). This is in accordance with the increase in grain yield components obtained under controlled conditions by Maignan et al., (2020), who also used spray application on winter wheat, but UAN was supplied as a foliar application. In our field trials, the N supply provided was close to wheat demand, while in the controlled conditions experiment, a lower dose was provided in the system. However, this grain yield augmentation is quite similar to the increases obtained with protein hydrolysate under field conditions in Poland (Popko et al., 2018), but higher than those obtained after foliar application of fulvic acid, seaweed extract, amino acids, microbial incubates (Wang et al., 2020) or Si (Kowalska et al., 2020). PGPR might also have significant results in wheat, but mainly under abiotic stresses like water deficiency (Karimzadeh et al., 2020) or in the absence of N fertilizer (Nguyen et al., 2019). Very interestingly, in controlled conditions, we have also reported that sprayed Glutacetine® significantly increased grain number per spike (Maignan et al., 2020). The present study confirmed the same level of amelioration under contrasting field conditions, and Glutacetine® seemed more efficient with urea (+9.6%) than UAN nutrition (+5.1% compared to the control). This could be due to the better fruiting efficiency (Pretini et al., 2020; Slafer et al., 2015) with Glutacetine®, which might have a strong impact on spike fertility (Maignan et al., 2020). In accordance with our findings, PGPR may also increase the number of grains per spike in wheat (Yadav et al., 2020). Nevertheless, there was no consistent change in the number of grains per ear following the application of protein hydrolysate (Popko et al., 2018). The positive effect of this kind of biostimulant was also observed in crops such as rice, finger millet, radish and cowpea where soil application was more efficient than foliar application (Subbarao et al., 2015).

Focusing on other yield components, Glutacetine® improved TGW under urea nutrition and especially at site 3 (Table IV.C.1 and Figure IV.C.1E), which is characterized by a superficial clay limestone soil type. This result seems surprising in light of our recent study performed on winter wheat under controlled conditions (Maignan et al., 2020), which demonstrated the negative effect of spraying Glutacetine® on TGW. This difference in the effect of Glutacetine®



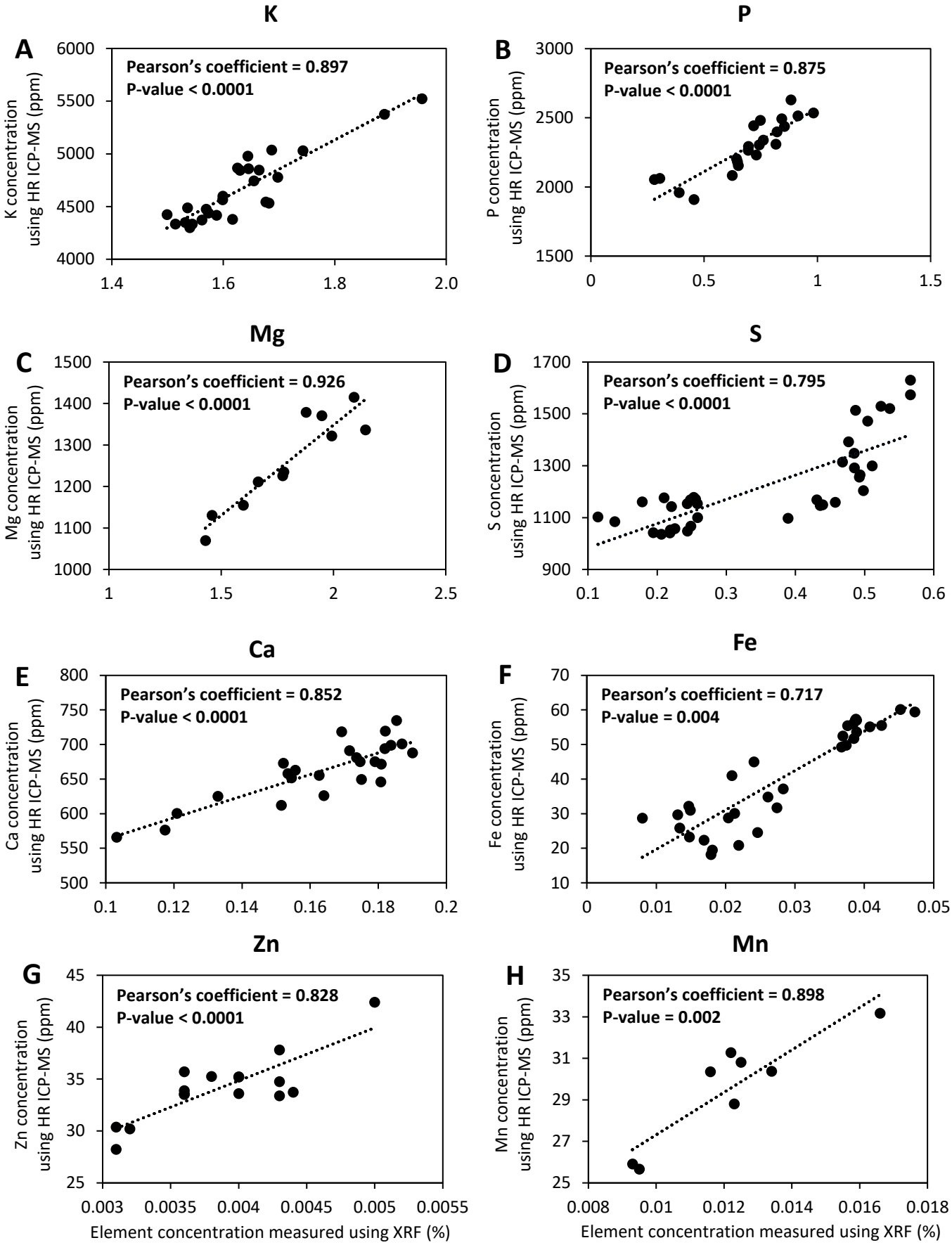
<u>Supplementary Figure IV.C.1</u> : Weather conditions for each site during the growing period. (A) Site 1, (B) Site 2 and (C) Site 3.

between the two experiments may be explained by the significant impact of weather conditions and soil type in the present work (Supplementary Figure IV.C.1 and Supplementary Table IV.C.1) versus the well-watered conditions of the greenhouse experiments. In addition, other biostimulants such as fulvic acid and PGPR have also enhanced TGW in sandy loam and clay loam soils in winter wheat (Sootahar et al., 2020; Yadav et al., 2020). A mixture of bioactive compounds was also able to increase TGW in maize (Hussain et al., 2020a). Thus, the present work indicated that spraying Glutacetine® has similar effects to other biostimulants, leading to an improvement in seed yield components.

III.2 Glutacetine® affects NUE and total grain N differently

Because organic matter was applied at site 1, N fertilizer was higher at site 2 and the previous crop at site 3 was a leguminous crop (*Medico sativa*) (Supplementary Tables IV.C.1 and 2), it was evident that these contrasting conditions strongly influence N-related traits in winter wheat. Indeed, we observed significant site effects on the %N in the flag leaf (Figure IV.C.3B and C), the grain and the straw, and this induced different levels of total grain N and NUE, irrespective of the N fertilizer form (Figure IV.C.2). However, the form of N fertilizer only had a strong effect on the N content in grain ($p < 0.001$) and on the total grain N ($p < 0.01$, Table IV.C.2). The high yield potential at site 2 due to its soil characteristics (see details in Supplementary Table IV.C.1) and the high N inputs (see details in Supplementary Table IV.C.2) might explain the lower effect of the N type at this site (Figures IV.C.2 and 3). However, the N concentration in the grain was reduced when wheat was fertilized with UAN compared to urea at each site (Figure IV.C.2A). Thus, this study demonstrated that using urea fertilizer on wheat is more efficient than UAN.

In our field experiments, it seemed that the impact of Glutacetine® on NUE was dependent on the site characteristics. Indeed, in comparison to the control, the increase in NUE (Figure IV.C.2D) by Glutacetine® observed at site 2 with urea nutrition was associated with a reduction in the %N in straw (Figure IV.C.2B) and a significant decrease in the %N in the flag leaf, as observed between heading and seed development (Figure IV.C.3D). These data suggest that the increase in the NUE by Glutacetine® (+7.2%) may be due to an improvement in the remobilization of N from leaves and straw. On the other hand, the present work also showed that Glutacetine® maintained high N content in the flag leaf at site 3, irrespective of the form of N fertilizer (Figure IV.C.3D). This outcome could be due to maintenance of post



<u>Supplementary Figure IV.C.2</u> : Relationship between element concentrations of wheat flour (*Triticum aestivum* L.) values obtained with the HR ICP-MS and XRF methods. (A) K content, (B) P content, (C) Mg content, (D) S content, (E) Ca content, (F) Fe content, (G) Zn content and (H) Mn content.

heading N uptake as demonstrated by Maignan et al. (2020) in winter wheat cultivated under controlled conditions. This result also suggests that the Glutacetine® supply increases the leaf life span *via* the maintenance of photosynthesis and/or delaying the foliar senescence. This last hypothesis is in agreement with previous studies showing that biostimulant applications such as Si that can delay leaf senescence in several plant species like oilseed rape (Haddad et al., 2018; Laîné et al., 2019), strawberries (Peris-Felipo et al., 2020) and wheat (Kowalska et al., 2020). PGPR might also enhance chlorophyll levels in leaves of wheat plants (Karimzadeh et al., 2020; Yadav et al., 2020). Moreover, we have shown that Glutacetine® slightly enhanced the total grain N and NUE in winter wheat, irrespective of the N form (Table IV.C.1). As previously reported (Haddad et al., 2018; Sestili et al., 2018), biostimulants can promote the expression of genes encoding for N transport and assimilation, which lead to an improvement in N uptake, especially after the heading stage (Maignan et al., 2020). Better N remobilization efficiency is also important for increasing total grain N and NUE (Kong et al., 2016); several biostimulants such as marine and fungal biostimulants improved total grain N (Laurent et al., 2020), while others like PGPR are able to increase NUE (Elhaissoufi et al., 2020) in wheat. Altogether, these results suggest that Glutacetine® applied on urea- or UAN-fertilized wheat crops enhances total grain N and NUE, probably due to an effect on N uptake and N remobilization efficiency after the heading stage.

III.3 Glutacetine® induces changes in the grain and straw ionomes

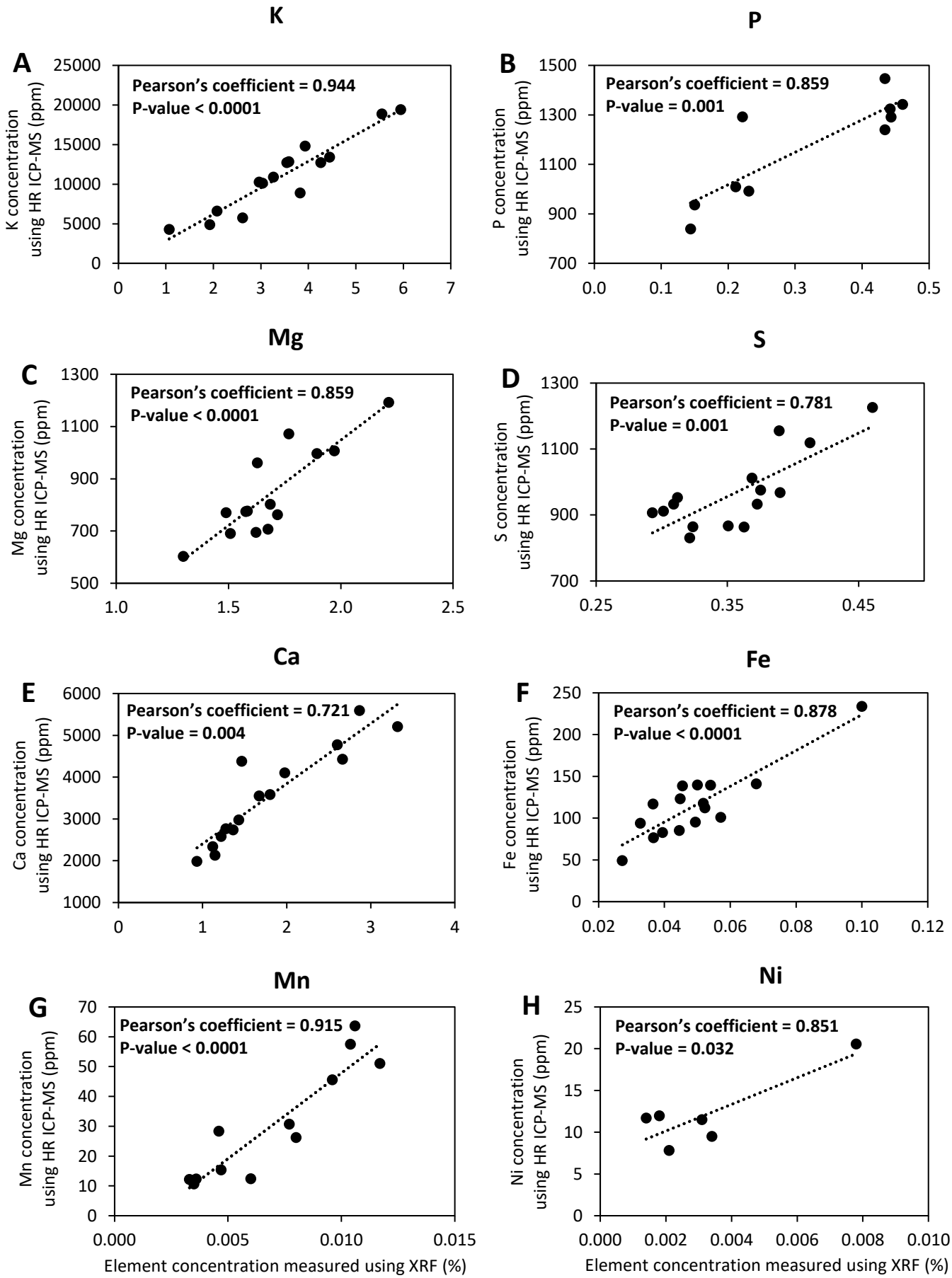
Mineral composition represents a major criterion of quality in bread wheat grain. While we did not show consistent change regarding ash content (data not shown), which is an indicator of mineral content that is important for human nutrition (Del Coco et al., 2019), the development of rapid and non-destructive XRF analyses of the grain ionome helped us to demonstrate the site dependency of the Ca, K, S and Zn contents in the wheat grain (Table IV.C.2). These site effects were more significant when urea was used compared to UAN, including for P (Table IV.C.2). Regarding the straw ionome, Ca, K, S and Fe content were also dependent on the site. These differences were mostly due to soil characteristics (Supplementary Table IV.C.1). Indeed, in our field conditions, Ca availability in the soil varied by a factor of 6 (2.1‰ at site 1, 3.6‰ at site 2 and 12.3‰ at site 3), which is strongly correlated with the Ca content in the grain and straw (Tables IV.C.3 and 4). However, while exchangeable K was lower at site 1 compared to the other two sites, the wheat grain and straw from this

Table IV.C.5 : The chemical composition of Glutacetine®.

Glutamic acid (%DW)		3.6
Organic acids (%DW)		7.4
Total Soluble Sugars (%DW)		10
Elements (%DW)	**Cl**	19.8
	Ca	15.6
	C	6.26
	N	0.76
	K	0.31
	Na	0.31
	Mo	0.15
Elements (mg kg^{-1} DW)	**S**	300
	B	30
	Mg	19
	Si	14
	P	9.5
	Cu	2.6
	Ni	1.8
	Co	0.6
	Zn	0.3
	Se	0.08

site did not have the lowest K content. There are two explanations for this finding: either the different wheat cultivars used at each site have contrasting K use efficiency (uptake and remobilization) and/or the organic matter input at site 1 released large amounts of K during the crop cycle, which compensated for the low levels of exchangeable K in the soil. In addition, Zn content in the grain was lower at site 2, probably because of the high yields, which induced a dilution of this microelement. Moreover, it is well documented that pH influences the bioavailability of chemical elements such as Fe in the soil and plays an important role in their availability to plants (Likar et al., 2015). The soil concentration and availability of mineral elements for plants generally decrease as the pH and Ca content increase (Krochmal-Marczak and Sawicka, 2008; Pérez-de-los-Reyes et al., 2013). In the present work, sites had contrasting pH (6.1, 7.3 and 8.4 at sites 1, 2 and 3, respectively) and CaO content (Supplementary Table IV.C.1), which could explain the higher Fe content in the straw from site 1.

Considering the multi-elemental composition of Glutacetine® (Table IV.C.5), it can be suggested that its function is to enhance nutrient uptake from the environment, as well as assimilation and translocation to grains, as this study showed (Tables IV.C.3 and 4). This is in agreement with published data about the action of other biostimulants in increasing plant mineral uptake and improving nutrient use efficiency (Butphu et al., 2020; du Jardin, 2015; Rouphael and Colla, 2018). The decrease in P content is in agreement with our previous work, which showed this effect with another Glutacetine®-derived formulation (Maignan et al., 2020), and may be associated with lower phytate content with antinutritional properties (Safar-Noori et al., 2018). Such variations in mineral composition and grain content are also a function of the biostimulant used and the crop tested. For example, seaweed extract has been reported to enhance the P concentration in winter wheat, but no consistent change was observed for K and Zn, while fulvic acid has been associated with an increase in Fe content (Wang et al., 2020). PGPR was able to increase P, Ca, Zn, Cu, Fe and B content in wheat grains (Yadav et al., 2020) whereas protein hydrolysate only affected Cu (Popko et al., 2018). In other species, a mixture of bioactive compounds induced a higher N, P and K content in maize (Hussain et al., 2020a), while Si supply improved the Fe concentration in grains of winter oilseed rape under two contrasting N fertilizer treatments (Laîné et al., 2019). On the other hand, an improvement in remobilization of these nutrients due to Glutacetine® spraying cannot be excluded (especially for Ca from straw at site 3 with UAN nutrition, Table IV.C.5),



<u>Supplementary Figure IV.C.3</u> : Relationship between element concentrations of wheat straw (*Triticum aestivum* L.) values obtained with the HR ICP-MS and XRF methods. (A) K content, (B) P content, (C) Mg content, (D) S content, (E) Ca content, (F) Fe content, (G) Mn content and (H) Ni content.

allowing the element concentration to be maintained in grain despite increases in yield. However, we could expect a higher response of wheat plants in terms of Ca content in grain because this element is important in the Glutacetine® formulation (15.6%DW, Table IV.C.5). The increase in nutrient concentrations in seeds might also be a consequence of stimulated root uptake after the heading stage, as demonstrated previously for N (Maignan et al., 2020).

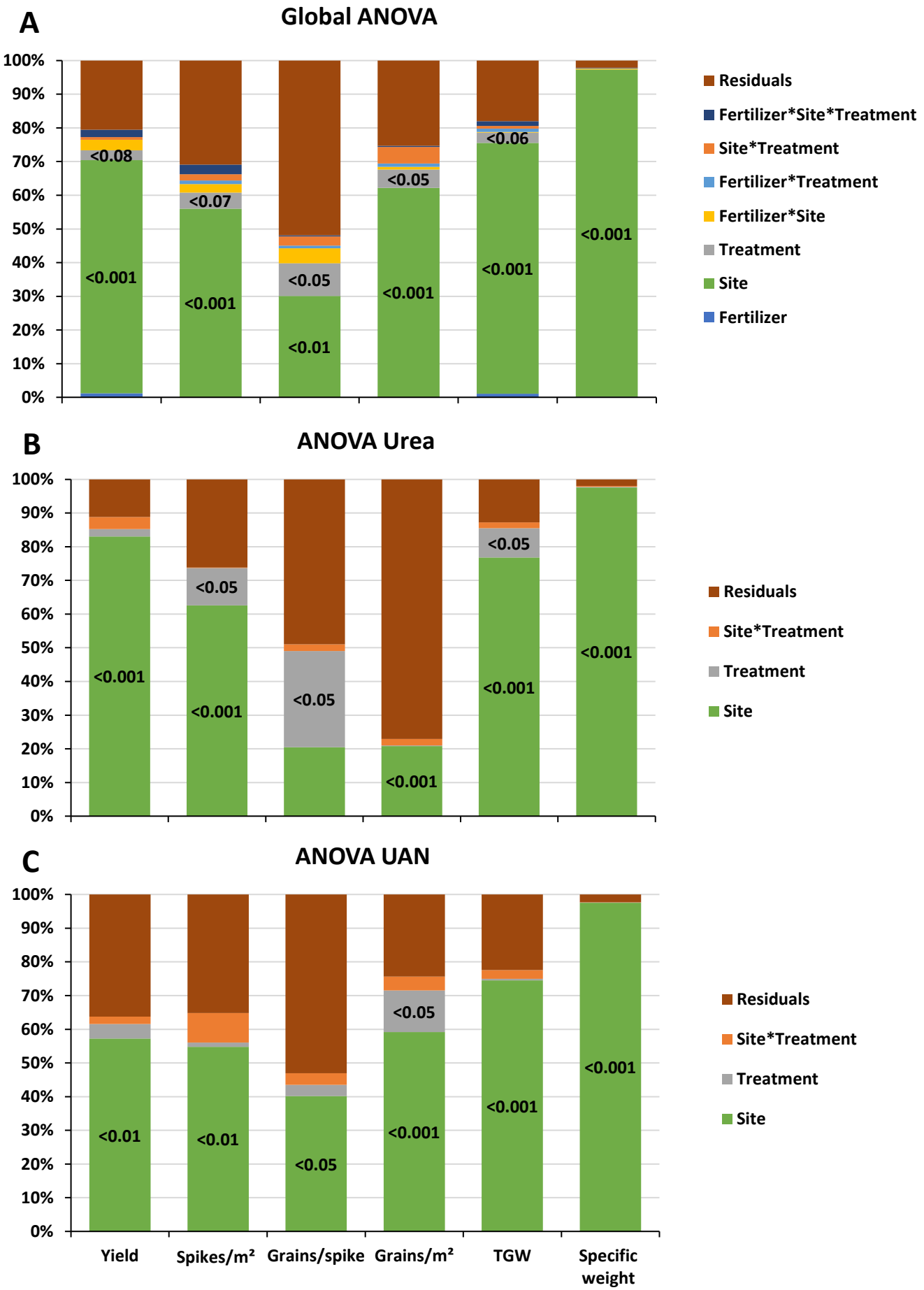
These results are particularly interesting for Mn because this micronutrient is important for plant metabolism and also for human nutrition and health (Broadley et al., 2007; Kobayashi et al., 2019; Qiao et al., 2019). Indeed, Mn has crucial roles as a cofactor or component of several key enzyme systems (Cu et al., 2020). In our work, at site 3 under UAN nutrition, the application of Glutacetine® increased grain yield by 724 kg ha^{-1} (Figure IV.C.1A), decreasing Fe content but not Zn content, whereas it significantly improved the Mn content (Table IV.C.3). Thus, to confirm this biofortification effect, further investigations will be necessary to verify whether Glutacetine® can stimulate Mn transporters in source organs during senescence, as observed for other biostimulants (Connorton et al., 2017; Pearce et al., 2014), and/or induce transcription factors such as no apical meristem (NAM) proteins that regulate the transport of this micronutrient to the grains (Waters et al., 2009).

IV. Materials and methods

IV.1 Field experiment design

During autumn 2018, three different cultivars of winter wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Sacremento, Libravo and Chevignon) were sown at three different sites in Normandy, France (see Supplementary Table IV.C.1 for more details), which belongs to the oceanic temperate region. Plot size was 24 m^2 (12 m × 2 m) and three replicates (plots) were used per treatment on each site. The adopted model of the field experiment was the randomized complete block design with three main blocks. From April 2019-June 2019, systematic applications of plant protection treatments were carried out. Weather conditions (average temperature and total rainfall) were from 11.9 to 12.4°C and from 588 to 611 mm between September 2018 and August 2019 (Supplementary Figure IV.C.1). Previous crops and soil properties were very different at each site (Supplementary Table IV.C.1).

All plots were fertilized with 30 kg S ha^{-1} at the tillering stage (BBCH 29, Lancashire et al., 1991). N fertilizer applications were intended to replicate farmer practice and were calculated using the method (the so-called “Méthode du Bilan”) described by the French



<u>Supplementary Figure IV.C.4</u> : Schematic representation of the ANOVA for yield, spike number per square metre, grain number per spike, grain number per square metre, thousand grain weight (TGW) and specific weight. (A) Global ANOVA using data obtained in the three sites and with the two fertilizers, (B) ANOVA Urea using data obtained from the three sites with urea fertilizer and (C) ANOVA UAN using data obtained from the three sites with UAN fertilizer.

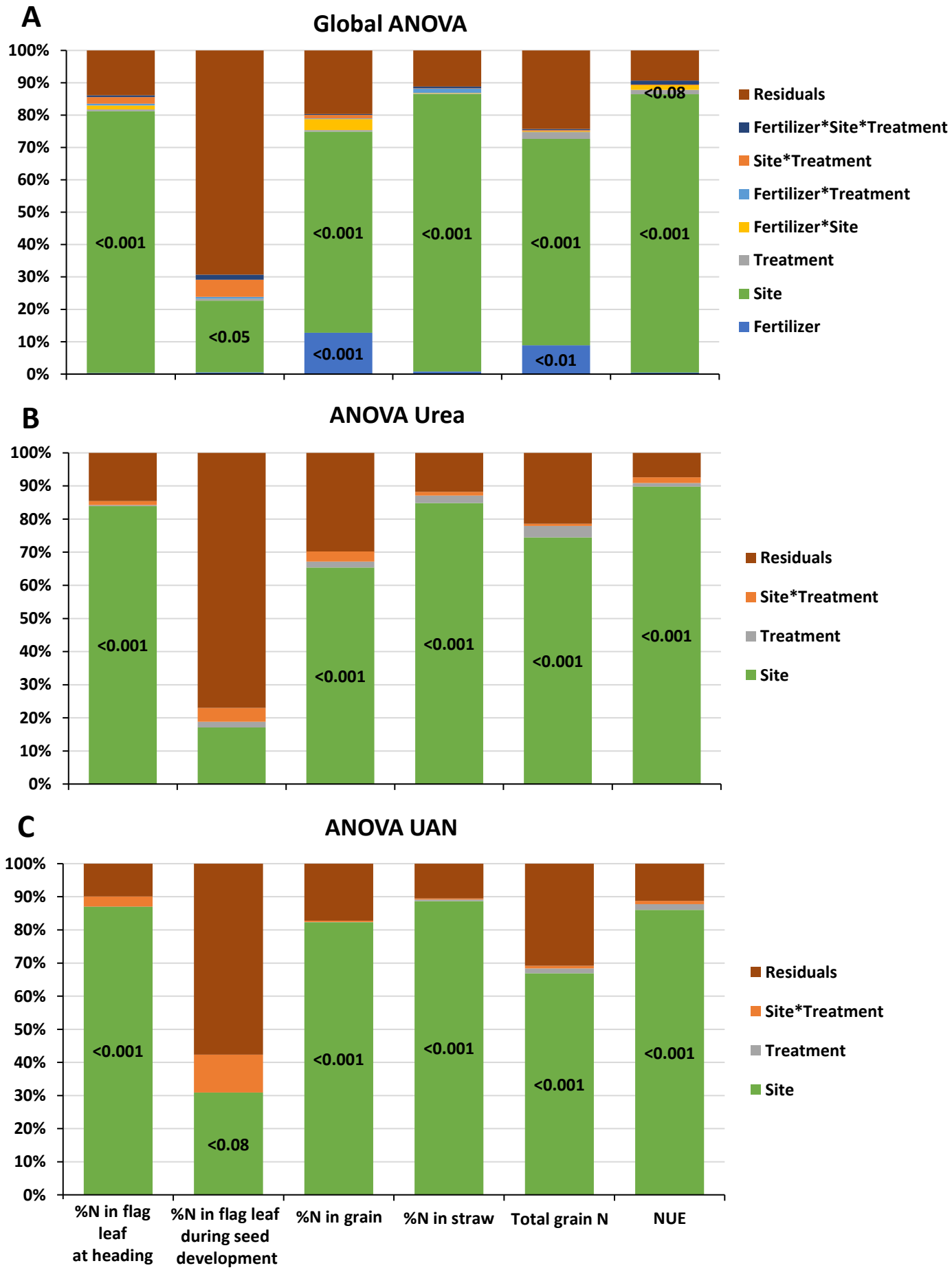
COMIFER committee (Comité français d'étude et de développement de la fertilisation raisonnée, 2000). This method measures the amount of mineral N in the soil in February to estimate the total soil N supply. With the estimation of total plant needs, the method allows the application of a N dose that is close to crop demand (Supplementary Table IV.C.2). Two different N fertilizers were used: 46% urea and a 39% ammonium nitrate urea solution (UAN). The N fertilizer dose was applied at 152, 210 and 152 kg N ha^{-1} at sites 1, 2 and 3, respectively (Supplementary Table IV.C.2). The first fertilizer dose was applied at tillering (BBCH 21), the second at stem elongation (BBCH 31) and the rest at the flag leaf stage (BBCH 39, Supplementary Table IV.C.2). For the last N application, we followed the new N requirement indicators ("bq" coefficient) for growing each bread wheat cultivar with the dual objective of optimum yield and grain protein content in line with market requirements (Cohan et al., 2019). For the biostimulant treatment, a Glutacetine® formulation (Table IV.C.5) was sprayed on each fertilizer type on the same day as the last N application (BBCH 39) to maximize the N uptake in plants. Then, 5 L ha^{-1} of Glutacetine® were mixed with water for spraying. The levels of chlorophyll in the flag leaf were determined *via* the SPAD index measured at heading and during seed development using a SPAD-502® chlorophyll meter (Konica Minolta Inc., Japan). Ear number was counted in each plot of the three sites and grain and straw were collected using a combine harvester. All samples were dried (60°C) for 48 h and then ground to a fine powder for elemental analysis.

IV.2 Seed yield components and N use efficiency

After harvesting of winter wheat, TGW (g), grain number per spike, grains per square meter, specific weight (grain density, kg hl^{-1}) and moisture (%) were determined. Yields were then calculated with standard moisture (15%) and NUE according to Moll et al. (1982) using the following equation: NUE (kg kg^{-1}) = Grain yield (kg ha^{-1}) / N supply (kg ha^{-1}).

IV.3 Elemental analysis

For N analysis in leaves, grain and straw, aliquots of each dried sample were placed into tin capsules using a microbalance and the total N concentration was determined with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Horizon, NU Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). Total grain N was then calculated (kg N ha^{-1}).

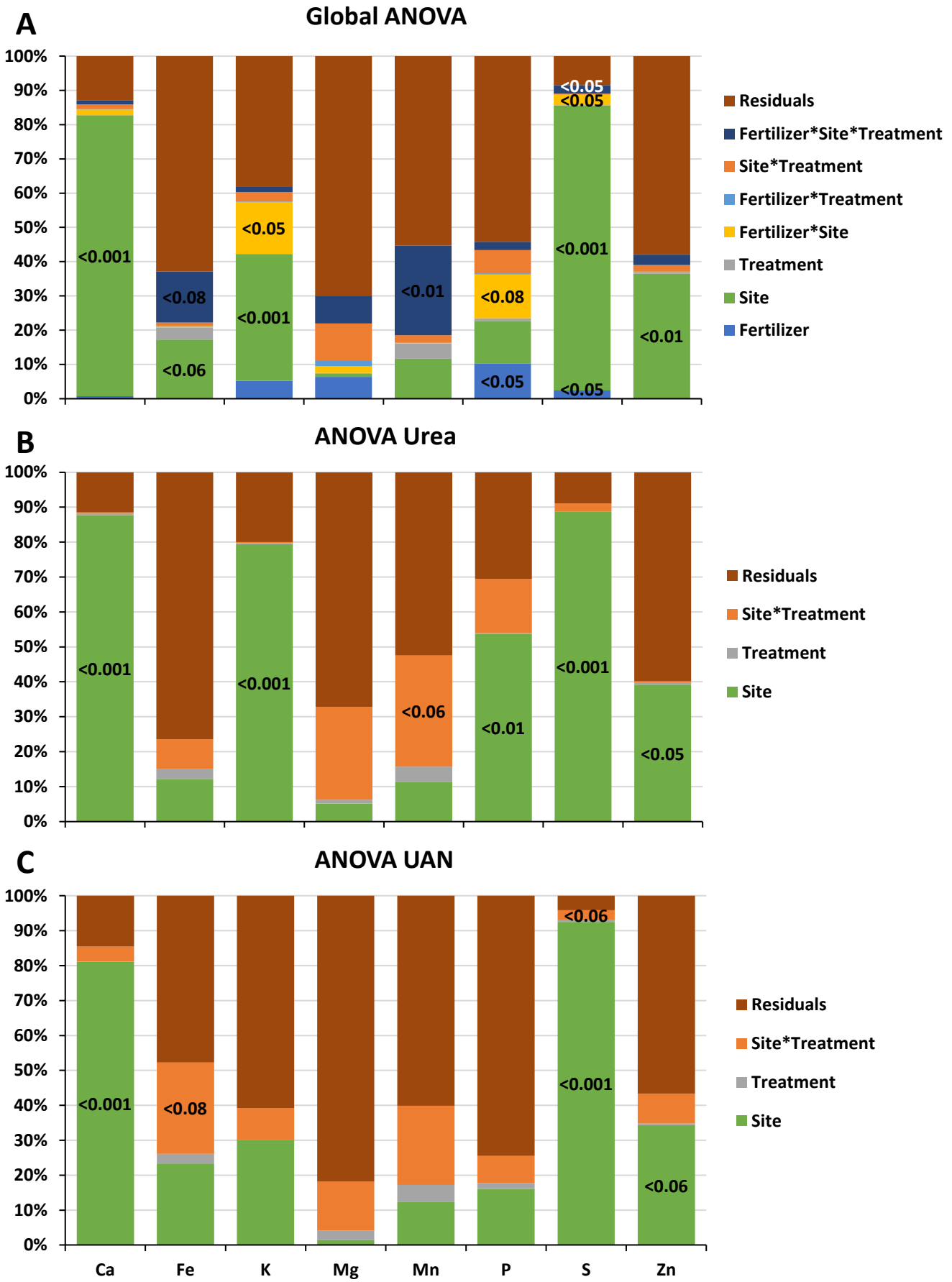


Supplementary Figure IV.C.5 : Schematic representation of the ANOVA of the %N in flag leaf at heading, %N in flag leaf during seed development, %N in grain, %N in straw, total grain N and N use efficiency (NUE). (A) Global ANOVA using data obtained in the three sites and with the two fertilizers, (B) ANOVA Urea using data obtained from the three sites with urea fertilizer and (C) ANOVA UAN using data obtained from the three sites with UAN fertilizer.

The grain and straw of winter wheat were also subjected to multi-elemental analysis (macronutrients and micronutrients) using the XRF technique (X-ray fluorescence). Because whole grain reference samples were not available, it was necessary to develop a set of calibration and validation standards for this study. A collection of bread wheat samples with variation in element concentrations was selected from a previous wheat experiment (Maignan et al., 2020). Selected samples were analyzed by a high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR ICP-MS, Thermo Scientific, Element 2^{TM}, Bremen, Germany). Dry matter of each of the samples (40 mg) was suspended with 800 µl of concentrated HNO_3, 200 µl of H_2O_2 and 1 ml of Milli-Q water. All samples were then spiked with two internal standard solutions containing gallium, rhodium and iridium with final concentrations of 10 and 2 µg L^{-1}, respectively. After microwave acidic digestion (Multiwave ECO, Anton Paar, les Ulis, France), all samples were diluted with 50 ml of Milli-Q water to obtain solutions containing 2% (v/v) nitric acid. Before HR ICP-MS analysis, samples were filtered at 0.45 µm using a Teflon filtration system (Digifilter, SCP Science, Courtaboeuf, France). Quantification of each element was performed using external standard calibration curves and concentrations were expressed in ppm. For each element, linear regression and correlation between XRF and HR ICP-MS data were assessed by Pearson's test using XLSTAT software (Addinsoft, France). Significant correlations were obtained for K, P, Mg, S, Ca, Fe, Zn and Mn in grain samples (Supplementary Figure IV.C.2). Except for Zn, all of these elements and Ni correlated in straw samples (Supplementary Figure IV.C.3). Subsequently, all grain and straw samples were placed in sample cups and element concentrations were determined with an XRF analyzer (Portable XRF S1 TITAN 800, Bruker, Kalkar, Germany). Quantification of each element was performed using calibration curves of samples quantified by HR ICP-MS (Supplementary Figures IV.C.2 and 3).

IV.4 Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R Statistical Software version 3.3. The normality of data and the homogeneity of variance were verified using the Shapiro and Levene tests, respectively. When data followed a normal distribution, one-, two- or three-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the effect of site (S), fertilizer forms (F) (i.e., urea or UAN solution), Glutacetine® (treatment, T) and their interactions (S × F, S × T, F × T and S × F × T, Supplementary Figures IV.C.4 to 7). The resulting variations in data are expressed as the mean ± standard error (SE) for n = 3 and significantly different means between treatments



Supplementary Figure IV.C.6 : Schematic representation of the ANOVA of the grain ionome (elements detected in all samples by XRF; Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, S and Zn). (A) Global ANOVA using data obtained in the three sites and with the two fertilizers, (B) ANOVA Urea using data obtained from the three sites with urea fertilizer and (C) ANOVA UAN using data obtained from the three sites with UAN fertilizer.

were separated with Fisher's test ($p \leq 0.05$). Some sets of data were transformed using the Box-Cox method in order to obtain a normal distribution and apply ANOVA and Fisher's test. When variables did not satisfy normality due to culture effects, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used ($p \leq 0.05$).

V. Conclusion

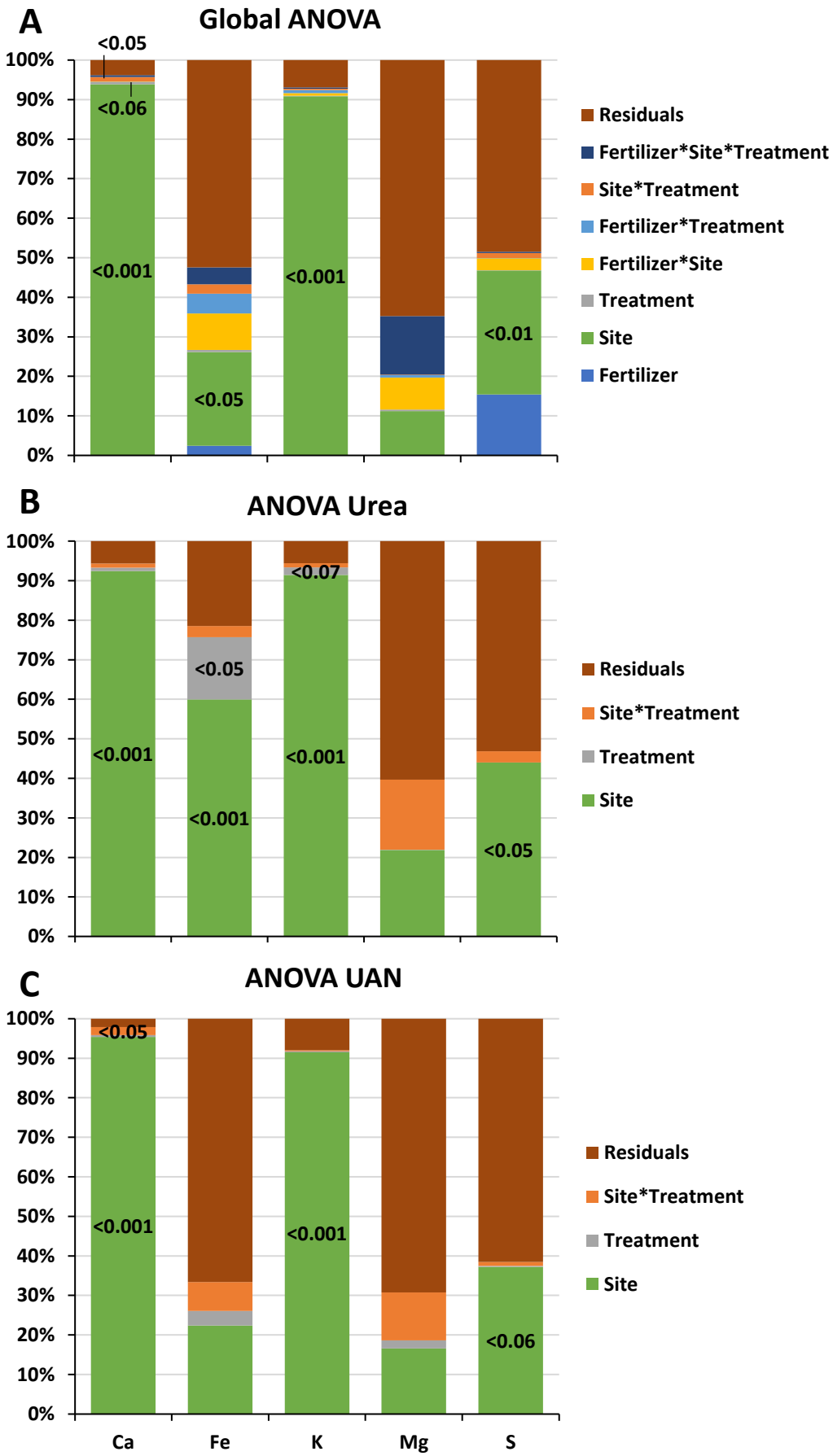
This study has established that the spraying of Glutacetine® onto winter wheat under field conditions leads to significant amelioration of grain yield components, leading to better yield. In our field conditions, the improvement in N-related traits (mainly total grain N and NUE) is probably due to a better post-heading N uptake and/or a better N remobilization efficiency, as observed in the leaf N status. In addition, Glutacetine® might promote Mn biofortification in the winter wheat grain. Moreover, XRF is a promising tool for rapid analysis of the grain and straw ionomes and could have value as an efficient diagnostic tool to support sustainable agriculture. Indeed, knowledge of the effectiveness of mineral fertilizers as well as the action of biostimulants in improving fertilizer efficiency is essential to achieve significant increases in yield and the quality of harvested products. Altogether, the results confirmed the importance of Glutacetine® application for farmers who use urea or UAN fertilizer on winter wheat crops, and the use of the SPAD-502® chlorophyll meter to follow N-related traits and XRF to analyze wheat grain and straw ionomes.

Author contributions

Conceptualization, V.M., P.G. and J-C.A.; methodology, V.M. and J-C.A.; software, V.M.; validation, V.M. and J-C.A.; formal analysis, V.M.; investigation, V.M. and J-C.A.; resources, V.M., P.G. and J-C.A.; data curation, V.M.; writing-original draft preparation, V.M. and J-C.A.; writing-review and editing, V.M. and J-C.A.; visualization, V.M.; supervision, J-C.A. and P.G.; project administration, V.M., P.G. and J-C.A.; funding acquisition, V.M., P.G. and J-C.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research and the APC were funded by ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie), which has supported this work as part of a PhD thesis (CIFRE 2017/1239), and by the Région Normandie and FEADER, which supported the FIELD-Prot project (EIP-AGRI).



<u>Supplementary Figure IV.C.7</u> : Schematic representation of the ANOVA of the straw ionome (elements detected in all samples by XRF; Ca, Fe, K, Mg and S). (A) Global ANOVA using data obtained from the three sites and with the two fertilizers, (B) ANOVA Urea using data obtained from the three sites with urea fertilizer and (C) ANOVA UAN using data obtained from the three sites with UAN fertilizer.

Acknowledgments

The authors deeply thank Régis Vecrin, Pierre-Vincent Protin and Frédéric Cardon for their involvement in this work and their valuable advice. The authors acknowledge Dr. Servane Lemauviel-Lavenant for her expertise in the statistical analyses and Laetitia Mabire, Marine Louargant, Raphaël Coquerel and Thibaut Chouanneau for helping with plant culture, measurements and harvesting. We are most grateful to the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for all the elemental analyses done by IRMS and HR ICP-MS used in this study. We thank Laurence Cantrill for correction and improvement of the English in the manuscript.

D. VNT4, une formulation dérivée du biostimulant Glutacétine®, améliore le rendement et les composantes liées à l'EUA chez le blé tendre lorsqu'il est mélangé à la solution azotée

***Agronomy*, 2021, https://doi.org/10.3390/agronomy11051013**

Contexte : L'optimisation de l'efficience d'usage de l'azote (EUA) est un enjeu majeur pour limiter les pertes dans l'environnement tout en maximisant les performances agronomiques des céréales. Dans un contexte de développement durable, l'utilisation d'additifs aux fertilisants azotés permettant d'améliorer leur efficacité s'est développée ces dernières années. Compte-tenu des résultats obtenus en conditions contrôlées montrant que l'ajout de VNT4 à la dose 3 (3 x 5 L ha^{-1}) augmente significativement le rendement, l'indice de récolte en azote et l'EUA, grâce à une meilleure absorption d'azote post-épiaison ainsi qu'une forte efficience de remobilisation de l'azote (des pailles et des racines), des expérimentations ont été conduites afin d'étudier l'impact de cet additif sur les performances agronomiques du blé en conditions de plein champ.

Objectif : Cette étude réalisée dans des conditions pédoclimatiques contrastées a pour but d'étudier l'impact de l'ajout de VNT4 à chaque apport de solution azotée sur les performances agronomiques et l'EUA du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) ayant reçu une fertilisation optimale ou sous-optimale.

Démarche expérimentale : Les plantes ont été cultivées dans six parcelles normandes ayant des caractéristiques pédoclimatiques contrastées pendant deux ans. La fertilisation azotée a été pilotée selon la méthode du bilan et le coefficient « bq » afin d'apporter une dose de solution azotée optimale la première année et sous-optimale la seconde (-40 kg N ha^{-1} par rapport à la dose optimale). VNT4 a été mélangé à la solution azotée à raison de 5 L ha^{-1} à chaque apport. La deuxième année, un site a été suivi plus précisément à l'aide d'un marquage ^{15}N et de récoltes intermédiaires.

Principaux résultats : Ce travail a montré l'impact significatif de VNT4 sur l'amélioration du rendement, de l'azote total dans les grains et de l'EUA quel que soit les conditions de culture. VNT4 favorise la croissance pendant les stades tallage et montaison, et l'absorption d'azote (principalement l'azote provenant de l'engrais) tout au long du cycle mais plus particulièrement à partir du stade dernière feuille étalée. En parallèle, VNT4 stimule la teneur en S, Zn et Mo dans les feuilles drapeaux, améliorant ainsi le métabolisme du blé pendant la phase reproductive. Ces résultats confirment l'intérêt d'ajouter VNT4 à la solution azotée pour améliorer son efficience et donc la production de blé en Normandie.

D. VNT4, a derived formulation of Glutacetine® biostimulant, improved yield and N-related traits of bread wheat when mixed with urea-ammonium-nitrate solution

Victor Maignan [1,2], Raphaël Coquerel [1], Patrick Géliot [2] and Jean-Christophe Avice [1]

[1] Normandie Univ, UNICAEN, INRAE, UMR EVA, SFR Normandie Végétal FED4277, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen, France

[2] Via Végétale, 44430 Le Loroux-Bottereau, France

Keywords: *Triticum aestivum*, nitrogen use efficiency, nitrogen fertilizer, UAN, VNT4, ^{15}N labelling

Abstract

Optimizing nitrogen use efficiency (NUE) could mitigate the adverse effects of nitrogen (N) fertilizers by limiting their environmental risks and raising agronomic performance. We studied the effects of VNT4, a derived formulation of Glutacetine® biostimulant, mixed with urea-ammonium-nitrate solution (UAN) on the growth, N-related traits and agronomic performance of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). The experiment was performed under six contrasting field conditions over two years in Normandy (France), including a site where ^{15}N labelling was undertaken. We report that VNT4 significantly improved grain yield (+359 kg ha^{-1}, global ANOVA), total grain N and NUE, irrespective of the site. VNT4 application improved growth during tillering and stem elongation (+10.7%), and N and ^{15}N uptake between tillering and maturity (+7.3% N and +16.9% ^{15}N) leading to a higher N accumulation at maturity (+9.3% N). This N mainly originated from fertilizer (+19.4% ^{15}N) and was assimilated after the flag leaf stage in particular (+47.6% ^{15}N). These effects could be related to maintenance of physiological functions of flag leaves as suggested by the enhancement of their nutrient status (especially S, Zn and Mo). The adoption of VNT4 as a UAN additive is an efficient agronomic practice to enhance wheat productivity under an oceanic temperate climate.

I. Introduction

Nitrogen (N) fertilization is a major input in intensive agricultural systems. It has been estimated that 48% of the global population was fed via N fertilizers in 2008 (Erisman et al., 2008). In addition, the use of N fertilizers has increased 8-fold since 1961 due to the growing

demand for agricultural products and especially crops (Lu and Tian, 2017). Thus, N fertilizer management is one of the most challenging tasks for cereal farmers with agronomic, economic, and environmental complexities (Tilman et al., 2002). Indeed, N chemical fertilizers are essentials to ensure yield and quality of the harvested products (Pan et al., 2020), but N fertilizers are involved in many environmental issues. Nitrate (NO_3^-) leaching and gaseous emissions of ammonia (NH_3) and nitrous oxide (N_2O) are harmful N pollutants, which also contribute towards lowering N use efficiency (NUE) when lost from agroecosystems (Räbiger et al., 2020; Ramanantenasoa et al., 2019). Nitrate leaching is an important contaminant of groundwater and surface water resources (Shukla and Saxena, 2020). Ammonia contributes to soil acidification, eutrophication/dystrophication and the formation of particles of a mean aerodynamic diameter smaller than 2.5 µg (PM2.5) that have been related to human respiratory distress (Misselbrook et al., 2000). Nitrous oxide is a greenhouse gas (GHG) with a global warming potential 298 times higher than CO_2 in the atmosphere, and it also contributes to the destruction of stratospheric ozone (van der Weerden et al., 2016). Thus, to mitigate these environmental issues, sustainable agricultural practices need to be implemented.

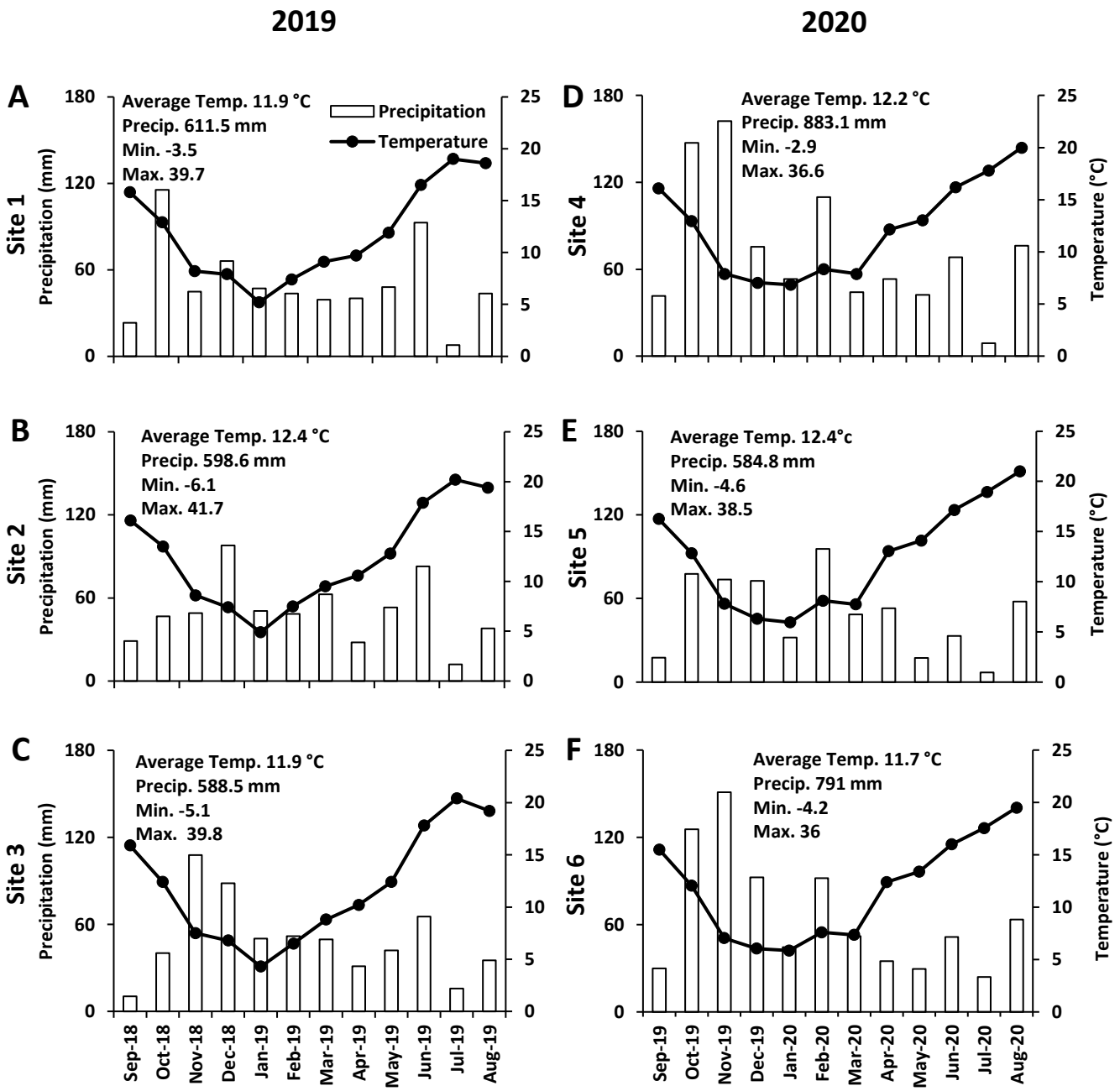
Strong efforts have been made to improve NUE through breeding programs (Cormier et al., 2016; Hawkesford, 2017; Ranjan and Yadav, 2020) and the enhancement of agronomic practices. For example, it is well documented that cover crops reduce nitrate leaching (Thapa et al., 2018). Besides, N interacts with other elements, which has strong repercussions on NUE. Among them, sulfur (S), molybdenum (Mo) and zinc (Zn) have synergistic effects with N (Imran et al., 2019b; Nie et al., 2019; Rossini et al., 2018); it is therefore important to have a good nutritional balance in wheat (*Triticum aestivum* L.) in order to ensure high NUE. During the crop cycle, it is recommended to divide fertilizer additions into four applications (Cohan et al., 2019), to spray N fertilizer at anthesis to stimulate N metabolism (Maignan et al., 2020; Anne Rossmann et al., 2019) or to apply late N nutrition (Rossmann et al., 2020) in order to avoid NH_3 volatilization and GHG emissions while enhancing NUE. These recommendations highlight that is necessary to apply the right dose at the right application time to increase the congruence between N supply and crop N demand and thus better manage N fertilization. Indeed, NUE, which is expressed as the harvestable yield per N supply (Moll et al., 1982), is correlated with the capacity of plants to take up, transport (Taulemesse et al., 2015), store and remobilize N (Barbottin et al., 2005; Hörtensteiner and Feller, 2002).

Supplementary Table IV.D.1 : Field sites and soil properties of the six experiments

Variant	2019			2020		
	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6
Location	49.26491, -0.87763	49.512660, 0.409829	48.851115, 0.023732	49.249615, -0.612199	48.829081, 1.230917	48.865838, 0.021099
Previous crop	*Beta vulgaris*	*Linum usitatissimum*	*Medicago sativa*	*Beta vulgaris*	*Brassica napus*	*Brassica napus*
Wheat cultivar	Sacramento	Libravo	Chevignon	Adoration	Boregar	Extase
Sowing date	17-11-2018	16-10-2018	16-10-2018	28-12-2019	10-10-2019	25-10-2019
Organic matter input	Yes	No	No	No	No	No
Soil type	Clay loams / Frank loams	Deep silt	Superficial clay limestone	Deep silt	Deep silt	Medium limestone clay
pH (water)	6.2	7.3	8.4	6.9	7.4	8.1
CEC (mol kg^{-1})	9.5	8.5	10.8	8.1	13.6	13.2
Organic matter (%)	2.4	2.1	3.4	1.6	2.4	4.1
C/N Ratio	Not determined	8.1	7.6	10.4	13.9	8.8
Total N (%)	Not determined	0.15	0.26	0.09	0.10	0.27
Organic C (%)	1.42	1.22	1.98	0.94	1.39	2.38
Assimilable P (ppm)	132	101	62	88	50	89
Exchangeable K (ppm)	168	238	254	215	130	337
Exchangeable Mg (ppm)	104	99	216	72	100	151
CaO (‰)	2.1	3.6	12.3	1.6	3.6	13.8

Another lever to improve NUE is based on enhanced-efficiency fertilizers (EEFs). These efficient fertilizers frequently contain inhibitors of urease and/or nitrification (Abalos et al., 2014). Urease inhibitors are compounds that delay the hydrolysis of urea, whereas nitrification inhibitors are compounds that delay bacterial oxidation of ammonium by depressing the activities of nitrifiers in the soil (Akiyama et al., 2010). N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT), which is a structural analogue of urea, is one of the most studied urease inhibitors (Krol et al., 2020). Regarding nitrification inhibitors, 3,4 dimethylpyrazole phosphate (DMPP) is widely used in Europe (Huf and Olfs, 2020). Both kinds of inhibitors have been shown to reduce NH_3 and N_2O loss while improving yield and NUE (Abalos et al., 2014; Nikolajsen et al., 2020). Nevertheless, these chemical inhibitors also affect soil microorganism activity and plant metabolism (Artola et al., 2011; Castellano-Hinojosa et al., 2019; Zanin et al., 2016). This is why environmentally friendly alternatives such as controlled-release fertilizers (CRFs) by coating fertilizer (Gil-Ortiz et al., 2020a) and/or biostimulants to form EEFs have been developed (Maignan et al., 2020). CRFs allow the slow delivery of nutrients, which can reduce the number of fertilizer applications and the total amount of fertilizer applied, resulting in increased fertilizer use efficiency. For N, CRFs such as S- or resin-coated urea can reduce N losses to the environment and improve grain yield in rice (Gil-Ortiz et al., 2020a; Sun et al., 2020). A recent meta-analysis indicated that CRF application significantly increased soil organic carbon, total N and available N by 5.93%, 3.89% and 13.98%, respectively, which increased the yield and NUE in wheat, maize and rice (Zhu et al., 2020). Due to their ability to slowly release nutrients, it was recently demonstrated that biochar-based controlled treatment also improved maize (*Zea mays* L.) grain yield when applied alongside inorganic N on sandy soils with poor physical and chemical properties (Omara et al., 2020). Other EEFs based on ecological raw materials have been recently developed and include biostimulants such as humic acids, seaweed or fungal extracts (Gil-Ortiz et al., 2020b; Wang et al., 2020).

Indeed, according to the EU regulation 2019/1009, “a plant biostimulant is a product that stimulates plant nutrition processes independently of the product’s nutrient content with the sole aim of improving one or more of the following characteristics of the plant or the plant rhizosphere: (a) nutrient use efficiency; (b) tolerance to abiotic stress; (c) quality traits; (d) availability of confined nutrients in the soil or rhizosphere”. Biostimulants influence



<u>Supplementary Figure IV.D.1</u> : Weather conditions for each site during the growing period. (A) Site 1, (B) Site 2, (C) Site 3, (D) Site 4, (E) Site 5 and (F) Site 6.

phenotypic traits and improve yield mainly by enhancing nutrient uptake and assimilation (Kabir et al., 2020; Nguyen et al., 2019). This is why, bioactive substances and microorganisms are of interest for improving nutrient use efficiency (du Jardin, 2015; Yakhin et al., 2017). Regarding N nutrition, it is well documented that biostimulants can improve N acquisition (Dellagi et al., 2020; Laurent et al., 2020) and plant N metabolism (Yu et al., 2010), for example, by delaying senescence (Haddad et al., 2018) or increasing remobilization efficiency (Maignan et al., 2020). In addition, biostimulants are also modulated by N fertilizers (Laîné et al., 2019; Nguyen et al., 2019). This is the capacity of biostimulants to improve NUE, which is the main reason that they have been gaining ground in agricultural systems (Rouphael and Colla, 2018). These products can therefore be used to complement fertilizers (Calvo et al., 2014). Although the costs of these EEFs are usually higher than conventional fertilizers, their application can reduce the amount of residual nutrients in the soil and improve both crop yield and economic efficiency in crops such as wheat.

Wheat is one of the most important cereal crops and needs high N fertilizer inputs in order to achieve high yield and protein content in the grain (De Santis et al., 2020; Styczen et al., 2020). The dynamics of nutrient exchange have been well studied in wheat (Hawkesford et al., 2018), especially related to N (Barbottin et al., 2005; Kong et al., 2016; Wang et al., 2011; Yan et al., 2020). Despite strong efforts to breed new cultivars and to improve agronomic practices that enhance NUE, it has been estimated that only one third of applied N is recovered in the harvested component of grain crops (Hawkesford and Riche, 2020). This means that it is necessary to find new methods adapted to different cropping systems. Consequently, both local and crop-specific solutions will be required for NUE improvement. In this context, EEFs could be an interesting way to increase fertilizer use efficiency while avoiding N loss and improving NUE in wheat. Many studies have reported that biostimulants could ameliorate wheat productivity and quality. For example, a fulvic acid extract enhanced soil properties and induced better growth, yield and nutritional status in wheat (Kumar Sootahar et al., 2020). *Bacillus* strains have been shown to increase bread wheat performance under different N supply (Nguyen et al., 2019), while marine and fungal biostimulants led to a small increase in grain yield in durum wheat (Laurent et al., 2020). Mixed with N fertilizer, biostimulants such as Glutacetine® have improved yield and N-related traits in winter wheat under controlled conditions (Maignan et al., 2020) and under contrasting field trials (Maignan et al., 2021).

<u>Supplementary Table IV.D.2</u> : Management of N fertilizer inputs for the six field experiments

Variant	2019			2020		
	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6
Humus effect	65	50	30	40	35	25
Previous crop effect	20	0	40	20	20	20
Organic matter supply effect	12	0	0	0	0	0
N uptake	10	29	26	0	15	20
N residue (NO_3^-/NH_4^+)	33 (25/8)	35 (33/2)	42 (34/8)	30 (26/4)	39 (28/11)	24 (21/3)
Total N soil supply (kg N ha^{-1})	140	114	138	90	109	89
Crop needs	272	304	270	285	234	288
N remaining	20	20	20	20	15	20
Total needs	292	324	290	305	249	308
N fertilizer input	152	210	152	215 - 40 = 175	132 - 40 = 92	219 - 40 = 179
Supply 1	61	100	62	40 + 77	60	106
Supply 2	31	50	30	18	0	13
Supply 3	60	60	60	40	40	60

Furthermore, a ureic-based controlled-release fertilizer formulated with water-soluble polymeric coatings enriched with humic acids or seaweed extracts also enhanced yield in wheat (Gil-Ortiz et al., 2020b). Nevertheless, there has been a lack of research into combining biostimulants and N fertilizers to improve wheat productivity and NUE in temperate-climate regions. Moreover, the performance of these products is determined by the dose and the date of application, and there is a substantial influence from the soil and weather conditions (Colla et al., 2017). Designing and developing new EEFs is thus an essential process that requires accurate testing of the products' effects on yield and N-related traits under field conditions.

The goal of this study was to examine the effects of VNT4, a derived formulation of Glutacetine®, mixed with urea ammonium nitrate solution (UAN, forming an EEF) on grain yield and N-related traits in winter wheat under field conditions in a temperate climate. Experiments were carried out at six different sites in Normandy (France) for two years to evaluate the possible beneficial effects of this EEF applied on different cultivars under optimal or suboptimal N conditions and to understand its influence on NUE and yield components. Labelled $^{15}NH_4{}^{15}NO_3$-$CO(^{15}NH_2)_2$ was applied in parallel microplots to study the main processes involved in N uptake, assimilation and remobilization, with the aim of discovering the most efficient strategies.

II. Materials and methods

II.1 Field experiment design under contrasting conditions (Experiment 1)

In 2018 and 2019, experiments were carried out at six sites, each with a different cultivar of winter wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Sacremento, Libravo, Chevignon in 2018; Adoration, Boregar and Extase in 2019) in Normandy, France (see Supplementary Table IV.D.1 for more details), which is classified as having an oceanic temperate climate. Plot size was 24 m² (12 m x 2 m) and three and four replicates (plots) were used per treatment at each site during the first and the second year, respectively. The experimental design was a randomized complete block design with 42 and 48 microplots in 2019 and 2020, respectively, and data presented in this work is a subset of treatments. During the growing period, systematic applications of plant protection treatments were carried out. Weather conditions during crop cycle were from 11.7 to 12.4°C for average temperature and from 585 to 883 mm for total rainfall between September 2018 and August 2020 (Supplementary Figure IV.D.1). Previous crops and soil properties were very different at each site (Supplementary Table IV.D.1).

Table IV.D.1 : Composition of the VNT4 formulation

Component		Concentration
Glutamic acid (%)		3.6
Organic acids (%)		7.4
Total soluble sugars (g L^{-1})		34.4
Elements (%)	**Cl**	18.2
	Ca	13.4
	C	11.49
	N	0.88
	K	0.29
	Na	0.18
	Mo	0.18
Elements (ppm)	**S**	140
	B	20
	Mg	11
	Si	11
	P	10.2
	Cu	1.1
	Ni	0.6
	Co	0.4
	Zn	3.5
	Se	0.06

At each site, all plots were fertilized with 30 kg S ha^{-1} at the tillering stage during the first year (BBCH 29, Lancashire et al., 1991). N fertilizer applications were intended to replicate farmer practice and was calculated using the so called "Méthode du Bilan" described by the French COMIFER committee (Comité français d'étude et de développement de la fertilisation raisonnée, 2000). This method measures the amount of mineral N in the soil in February to estimate total soil N supply. With the estimation of total plant needs, the method allows application of an N dose that is close to the crop demand (Supplementary Table IV.D.2). The N content of the biostimulant was neglected for the calculation of N fertilization. Each plot was fertilized with 39% UAN. N fertilizer was applied at 152, 210 and 152 kg N ha^{-1} at sites 1, 2 and 3 in 2019, respectively. In 2020, we reduced the dose by 40 kg N ha^{-1} from the optimal amount calculated to create suboptimal N conditions: 175, 92 and 179 kg N ha^{-1} were applied at sites 4, 5 and 6, respectively (Supplementary Table IV.D.2). The first fertilizer application was undertaken at tillering (BBCH 20-25), the second at stem elongation (BBCH 31), and the last at the flag leaf stage (BBCH 39, Supplementary Table IV.D.2). For the last N application, we followed the new N requirement indicators ("bq" coefficient) indicating the amount of N to apply after stem elongation for growing each bread wheat cultivar with the dual objective of optimum yield and grain protein content in line with market requirements (Cohan et al., 2019). For the biostimulant treatment, 5 L ha^{-1} of VNT4 formulation (see Table IV.D.1 for more details) were mixed with UAN solution before each N application, leading to a global application of 15 L ha^{-1}. In parallel, NBPT was mixed at a concentration of 0.2 % in UAN at each N application (2 mL NBPT for 1 L of UAN) to compare VNT4 with this urease inhibitor. Ear number was counted in each plot of the six sites and grain and straw were collected using a combine harvester. All samples were dried (60°C) for 48 h and then ground to a fine powder using a Retsch MM200 mixer mill (Eragny sur Oise, France) for N analysis.

II.2 ^{15}N experiment under field conditions (Experiment 2, Site 4)

In 2019, winter wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Adoration) was sown on December 28th in the north of Normandy, France (49°25' N, 0°61' W, Site 4, Supplementary Table IV.D.1). Plot size was 4 m² (2 m x 2 m) and 2 m² inside this plot were treated with ^{15}N, four replicates (plots) were used per treatment, and the plots were randomized in four main blocks. N fertilization was the same as in Experiment 1: 175 kg N ha^{-1} of UAN were split into three applications (Supplementary Table IV.D.2). Each microplot received labelled UAN ($^{15}NH_4{}^{15}NO_3$-

$CO(^{15}NH_2)_2$, 98 atom % ^{15}N, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) with 2.5 ^{15}N atom % excess applied with or without VNT4 (5 L ha^{-1} with each N fertilization) at BBCH 2, 31 and 39. The first application at tillering was split between BBCH 20 and 25 due to the low biomass. A solution of 2.5 L of each treatment was prepared and homogenously applied over the soil surface of the microplots. Additionally, a control treatment with no fertilizer was included. These microplots were located at the end of the 24 m² plots. An area of 0.25 m² was harvested after each N fertilizer application (just before the next fertilization) and 0.25 m² at maturity to follow the growth throughout the crop cycle and calculate the Harvest Index (HI, HI = grain biomass / aerial biomass). At the heading, flowering, seed development and maturity stages, 20 flag leaves were separated in the 24 m² plots and at maturity, flag leaves, grain and straw were harvested for detailed analyses. All samples were then dried in an oven (60°C) for 48 h and ground to a fine powder using a Retsch MM200 mixer mill (Eragny sur Oise, France) for elemental analysis.

II.3 N and ^{15}N analyses

For N and ^{15}N analysis in shoots, flag leaves, grain and straw, an aliquot of each dried sample was weighed and placed into tin capsules using a microbalance. The total N concentration was determined with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Horizon, NU Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). For experiment 1, total grain N was then calculated (kg N ha^{-1}) for all sites. For experiment 2, N and ^{15}N uptake between each fertilizer supply, the total N and ^{15}N in aerial parts at each harvest, and the N harvest index (NHI, NHI = total grain N / total N in aerial parts) and ^{15}N Harvest Index (^{15}NHI, ^{15}NHI = total grain ^{15}N / total ^{15}N in aerial parts) were calculated. When calculation of ^{15}N uptake resulted in a negative value, it was considered to represent 0 mg N m^{-2}.

II.4 Elemental analysis in flag leaves

S, Mo and Zn in wheat flag leaves were quantified by inductively high-resolution coupled plasma mass spectrometry (HR ICP-MS, Thermo Scientific, Element 2^{TM}) with prior microwave acid sample digestion (Multiwave ECO, Anton Paar, les Ulis, France) (800 µl of concentrated HNO_3, 200 µl of H_2O_2 and 1 ml of Milli-Q water for 40 mg DW). For the determination by HR ICP-MS, all the samples were spiked with two internal-standard solutions of gallium and rhodium for final concentrations of 10 and 2 µg L^{-1}, respectively, diluted to 50

Table IV.D.2 : Effects of site (S) and/or biostimulant treatment (T: VNT4) on grain yield, yield components and N-related traits determined by two-way ANOVA (global ANOVA and for each year).

Parameter	Global ANOVA			ANOVA 2019			ANOVA 2020		
	Site	Treat.	S x T	Site	Treat.	S x T	Site	Treat.	S x T
Yield	***	*	0.951	***	***0.073***	0.813	***	0.238	0.875
Spike m^{-2}	***	0.289	***0.050***	**	0.894	0.189	***	0.261	***0.074***
Grain $spike^{-1}$	***	0.952	0.142	*	0.733	0.370	**	0.857	0.123
Grain m^{-2}	***	***0.065***	0.994	**	***0.085***	0.906	0.262	0.397	0.999
TGW	***	0.267	0.455	**	0.977	0.519	***	0.117	0.318
Specific weight	***	0.687	0.524	***	0.636	0.433	**	0.959	0.597
%N in grain	***	0.148	0.672	***	0.678	0.816	0.226	0.123	0.454
%N in straw	***	0.291	0.995	***	0.210	0.567	*	0.448	0.906
Total grain N	***	*	0.835	***	0.232	0.727	**	***0.089***	0.575
NUE	***	*	0.893	***	***0.075***	0.819	***	0.291	0.965

*, **, *** = significant at 0.05, 0.01 and 0.001, respectively, p > F for n = 3 in 2019 and n = 4 in 2020. TGW: Thousand Grain Weight; NUE: Nitrogen Use Efficiency.

ml with Milli-Q water to obtain solutions containing 2.0% (v/v) nitric acid, then filtered at 0.45 µm using a teflon filtration system (Filtermate, Courtage Analyses Services, Mont-Saint-Aignan, France). Quantification of each element was performed using external standard calibration curves. The amount of a given element, E, was calculated from DW, and element concentration (%E as % of DW) as: E = (%E × DW) / 100.

II.5 Grain yield components and N use efficiency

After harvesting of winter wheat, 1000 grain weight (TGW, g), grain number per spike, grain per square metre, specific weight (grain density, kg hl^{-1}) and moisture (%) were determined. Grain yields were then calculated with a standard moisture (15%) and NUE according to Moll et al. (1982) using the following equation : NUE (kg kg^{-1}) = Grain yield (kg ha^{-1}) / N supply (kg ha^{-1}).

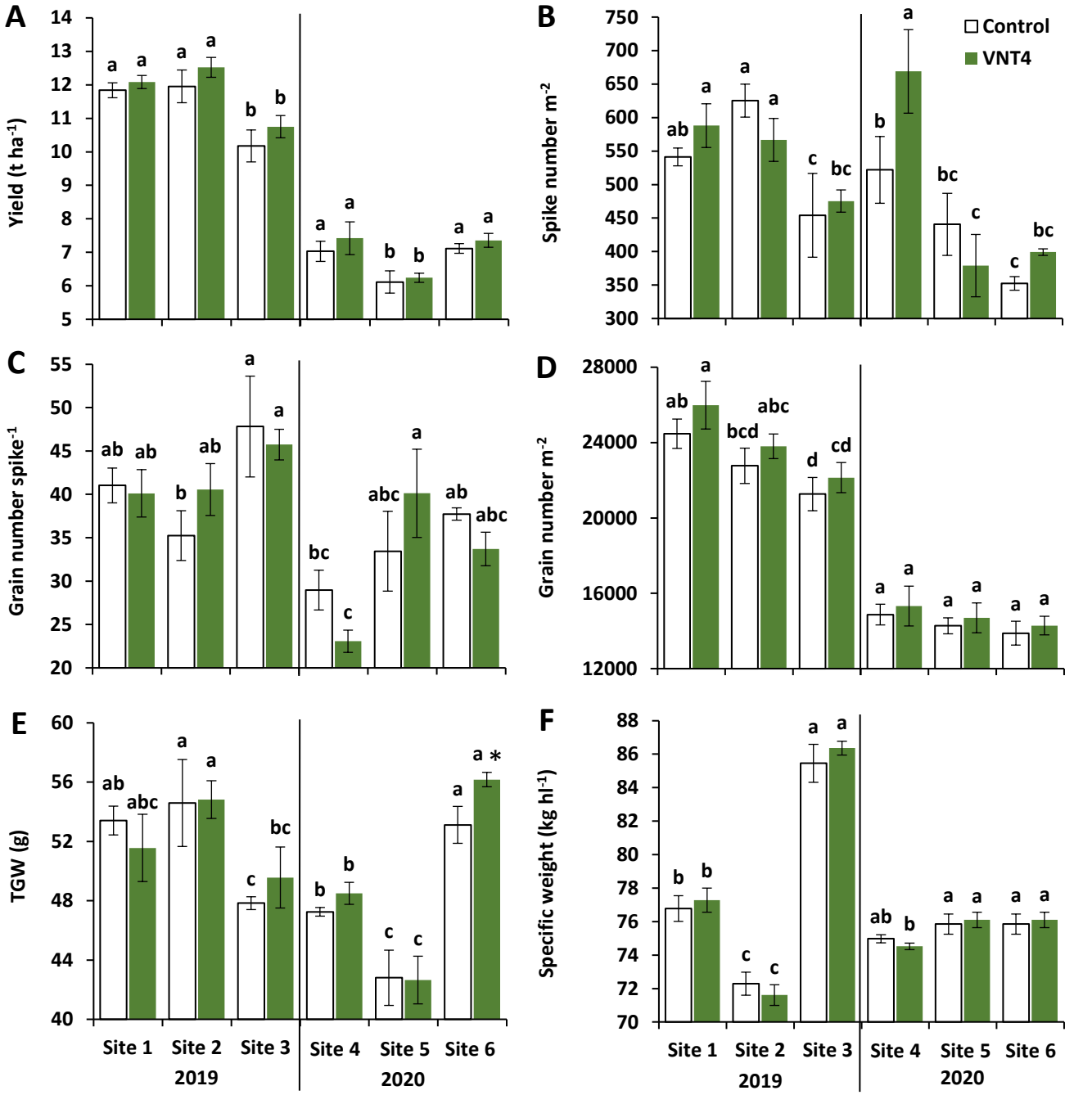
II.6 Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R Statistical Software version 3.3. The normality of data and the homogeneity of variance were verified using the Shapiro and Levene tests, respectively. When data followed a normal distribution, one-, or two-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the effect of site (S), VNT4 (treatment, T) and their interaction (S x T). The resulting variations in data are expressed as the mean ± standard error (SE) for n = 3 in 2018-2019 and n = 4 in 2019-2020. Significant differences of means between treatments were separated with Fisher's test ($p \leq 0.05$). Some sets of data were transformed using the Box-Cox method in order to obtain a normal distribution and apply ANOVA and Fisher's test. When variables did not satisfy normality due to culture effects, the non-parametric Kruskal–Wallis test was used ($p \leq 0.05$).

III. Results

III.1 Experiment 1: study of the impact of VNT4 on grain yield, yield components and N-related traits under six contrasting field trials

In the present work, we evaluated the effect of 3 x 5 L ha^{-1} of VNT4, a derived formulation of Glutacetine® (Table IV.D.1), mixed with UAN, at the tillering, stem elongation and flag leaf stages, on the yield and N-related traits of winter wheat. The product was tested in six field trials for two years to access the biostimulant properties under contrasting conditions. We wanted to investigate whether application of VNT4 increased the efficiency of UAN, which is one of the most widely used N fertilizers.

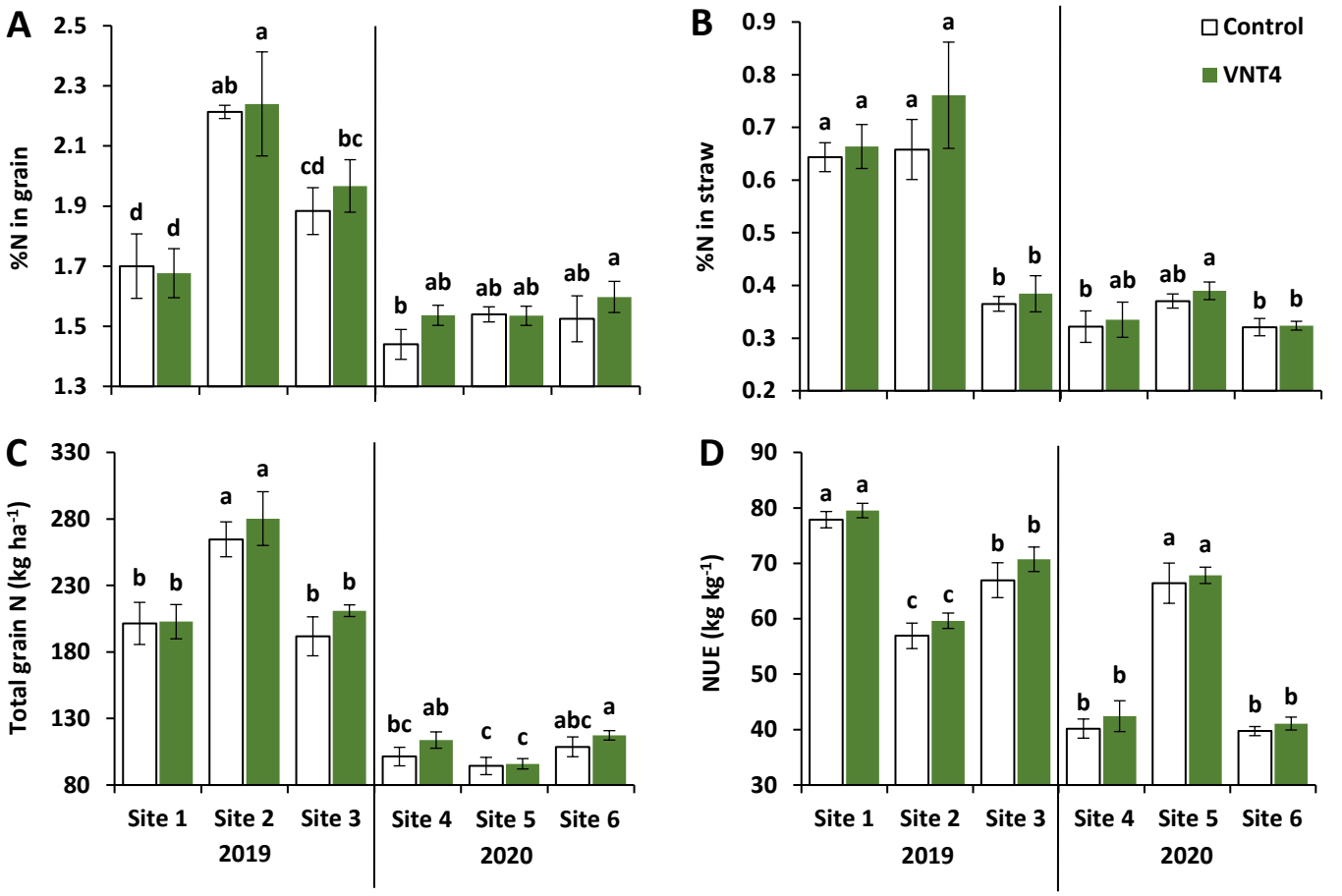


<u>Figure IV.D.1</u> : Influence of VNT4 on yield and its components in winter wheat under different site and year conditions. (A) Yield, (B) spike number per square metre, (C) grain number per spike, (D) grain number per square metre, (E) thousand grain weight (TGW) and (F) specific weight. Plant culture was carried out under six different field conditions in France, Normandy. N was provided at the tillering, stem elongation and flag leaf stages. 5 L ha^{-1} of VNT4 formulation (see Table IV.D.1 for more details) were mixed with UAN before each N application, leading to a global application of 15 L ha^{-1}. Bars indicate means ± SE. Different letters denote significant differences in 2019 or 2020 according to Fisher's test ($p < 0.05$; n = 3 in 2019, n = 4 in 2020) and star denote significant difference between control and VNT4 according to a pairwise com-parison (Fisher's test, ∗; $p < 0.05$, n = 4).

III.1.a Impacts of year, site and VNT4 on grain yield and its components

To better understand the impact of site, VNT4 and their interaction, a global ANOVA was first undertaken for grain yield and several yield components (spike number per square metre, grain number per spike, grain number per square metre, TGW and specific weight). Depending on the field conditions, grain yields ranged from 6.11 to 12.52 t ha^{-1}. As wheat was under optimal conditions in 2019 and under suboptimal conditions in 2020 (40 kg N ha^{-1} less than the recommendation), significant variations in yields between years were expected. The results over two years including six sites indicated strong site effects for grain yield and all yield components ($p < 0.001$, Table IV.D.2). Indeed, yields were much lower in 2020 than in 2019 (Figure IV.D.1A) due to both reduction in spike number per square metre (Figure IV.D.1B) and grain number per spike (Figure IV.D.1C), leading to a decrease in the grain number per square metre in 2020 (Figure IV.D.1D). However, there was no consistent change in TGW between 2019 and 2020 (49.8 g and 50.5 g on average, respectively), whereas there were contrasting site responses each year (Figure IV.D.1E). Specific weights were more homogenous in 2020 (from 74.5 to 76.1 kg hl^{-1}) than in 2019 and ranged from 71.6 (at site 2) to 86.4 kg hl^{-1} (at site 3, Figure IV.D.1F). Regarding site effects, we observed higher yields at sites 1 and 2 than at site 3 in 2019, while the lowest results in 2020 were at site 5 (Figure IV.D.1A). This is mainly explained by the reduction in spike number per square metre at site 3 in 2019 (Figure IV.D.1B). In 2020, the yield reduction at site 5 was not due to the number of grains per square metre (Figure IV.D.1D) but to the TGW which was significantly lower compared to the other sites (Figure IV.D.1E).

Interestingly, global ANOVA revealed a significant effect of VNT4 on yield ($p = 0.036$, Table IV.D.2), which increased by 463 kg ha^{-1} in 2019 (+4.1%) and by 255 kg ha^{-1} in 2020 (+3.8%, Figure IV.D.1A). Thus, globally, VNT4 improved yield by 359 kg ha^{-1} (+4%). In parallel, NBPT also significantly increased yield compared to the control ($p < 0.05$, +308 kg ha^{-1}, +3.4%, Supplementary Figure IV.D.2A). However, although VNT4 induced higher grain yields (+51 kg ha^{-1}) than NBPT, there was no significant difference between these two treatments (Supplementary Figure IV.D.2A). In 2019, VNT4 had a slight effect on yield ($p = 0.073$, Table IV.D.2) with an amelioration of 246, 569 and 574 kg ha^{-1} at sites 1, 2 and 3, respectively (Figure IV.D.1A). This improvement was either due to the increase in spike number per square metre (Figure IV.D.1B) or to a better grain number per spike (Figure IV.D.1C), leading to a better grain number per square metre irrespective of the site (Figure IV.D.2D and Table IV.D.2, $p = 0.065$).

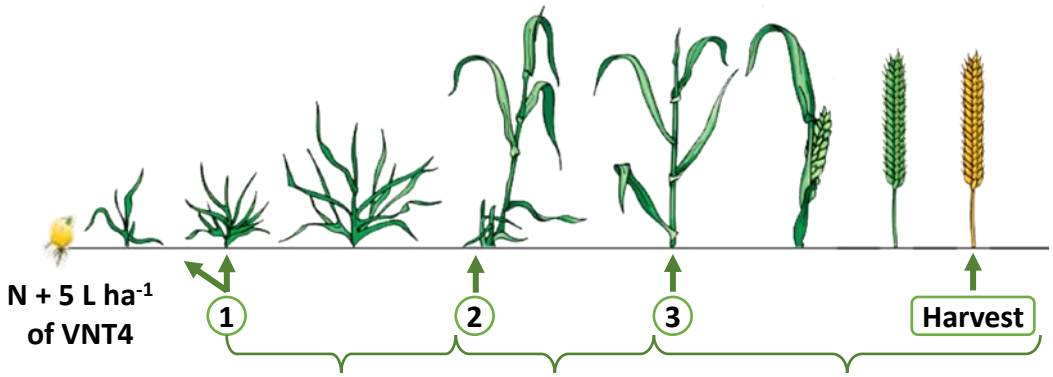


<u>Figure IV.D.2</u> : Influence of VNT4 on N-related traits in winter wheat under different site and year conditions. (A) N content in grain, (B) N content in straw, (C) total grain N and (D) NUE. Plant culture was carried out under six different field conditions in France, Normandy. N was provided at the tillering, stem elongation and flag leaf stages. 5 L ha^{-1} of VNT4 formulation (see Table IV.D.1 for more details) were mixed with UAN before each N application, leading to a global application of 15 L ha^{-1}. Bars indicate means ± SE. Different letters denote significant differences in 2019 or 2020 according to Fisher's test ($p < 0.05$; n = 3 in 2019, n = 4 in 2020).

Indeed, there was an interaction between site and treatment (S x T) for spike number per square metre (p = 0.05, Table IV.D.2). This component was increased by VNT4 at sites 1, 3, 4 and 6, whereas it was decreased at sites 2 and 5 (Figure IV.D.1B). Moreover, there was a slight S x T interaction the second year (p = 0.074, Table IV.D.2) mainly because VNT4 significantly improved spike number per square metre at site 4 (Figure IV.D.1B). In contrast to spike number per square metre, grain number per spike was improved at sites 2 and 5 (Figure IV.D.1C). Thus, VNT4 improved grain number per square metre at sites 1, 3, 4 and 6 by increasing the spike number per square metre, while at sites 2 and 5 grain number per spike improved (especially in 2019, p = 0.085, Table IV.D.2). Furthermore, there was no consistent change in TGW or specific weight after VNT4 application according to the global ANOVA (Table IV.D.2). However, VNT4 slightly enhanced TGW at site 6 (+5.7%, $p < 0.05$, pairwise comparison, Figure IV.D.1E). Altogether, these results indicated that VNT4 increased yield via different mechanisms depending on the site, but irrespective of the contrasting conditions (therefore, under both optimal and suboptimal N conditions). VNT4 enhanced spike number per square metre (especially at site 4), grain number per spike and TGW (especially at site 6).

III.1.b Effects of year, site and VNT4 on N-related traits

After the final harvest, global ANOVA revealed site effects ($p < 0.001$, Table IV.D.2) for the N concentration in grain and straw (Figure IV.D.2A and B). Regarding N content in grain, we observed lower concentrations in 2020 than in 2019 (Figure IV.D.2A), which was consistent with the N conditions for each year. Field conditions in 2019 resulted in strong differences between each site, with high N content in the grain at site 2, intermediate values at site 3 and a low N concentration at site 1 (Figure IV.D.2A), while there was no consistent change in 2020 (Table IV.D.2). However, there was a site effect in both years for N content in straw (Table IV.D.2). Indeed, the %N in straw was higher at sites 1 and 2 than site 3 in 2019, while it was better at site 5 than sites 4 and 6 in 2020 ($p < 0.01$, Figure IV.D.2B). The year and site effects were also consistent for total grain N and NUE (Figure IV.D.2 and Table IV.D.2). Because conditions were optimal in 2019 and suboptimal in 2020, the total grain N was greatly reduced in 2020 compared to 2019 (Figure IV.D.2C). Site conditions also had an important role in the accumulation of N in the grain. In 2019, total grain N was significantly higher at site 2 than sites 1 and 3, which seemed to be correlated with N content in the grain (Figure IV.D.2A and C). In 2020, total grain N was significantly lower at site 5 compared to sites 4 and 6 ($p < 0.05$, Figure IV.D.2C), which was due to the lower yields (Figure IV.D.1A). In addition, even though



Growth (gDW m^{-2})	Control	303.6 ± 26.0	519.8 ± 40.2	1174.1 ± 107.4
	VNT4	334.6 ± 31.5	576.9 ± 32.0	1006.5 ± 64
N uptake (gN m^{-2})	Control	6.78 ± 0.79	0.90 ± 0.83	5.02 ± 0.36
	VNT4	7.62 ± 0.69	0.59 ± 0.75	5.42 ± 0.37
^{15}N uptake (mgN m^{-2})	Control	93.16 ± 9.10	0	30.38 ± 4.05
	VNT4	105.70 ± 8.13	0	44.85 ± 4.95 ∗

Growth (gDW m^{-2})	Control	823.4 ± 30.8
	VNT4	911.6 ± 8.0 †
N uptake (gN m^{-2})	Control	7.68 ± 0.32
	VNT4	8.21 ± 0.43
^{15}N uptake (mgN m^{-2})	Control	89.00 ± 3.39
	VNT4	94.73 ± 3.74

Growth (gDW m^{-2})	Control	1997.5 ± 102.9
	VNT4	1918.1 ± 63.8
N uptake (gN m^{-2})	Control	12.70 ± 0.23
	VNT4	13.63 ± 0.23 ∗∗
^{15}N uptake (mgN m^{-2})	Control	119.38 ± 2.62
	VNT4	139.58 ± 4.33 ∗∗∗

Figure IV.D.3 : Influence of VNT4 on aerial biomass, N and ^{15}N accumulation in aerial parts between each N and VNT4 application at site 4 in 2020. Plant culture was carried out in France, Normandy. N was provided at the tillering, stem elongation and flag leaf stages. 5 L ha^{-1} of VNT4 formulation (see Table IV.D.1 for more details) were mixed with UAN before each N application, leading to a global application of 15 L ha^{-1}. Stars denote significant differences between control and VNT4 according to a pairwise comparison (Fisher's test: ∗; $p < 0.05$, ∗∗; $p < 0.01$, ∗∗∗; $p < 0.001$, or Kruskal-Wallis test: †; $p < 0.05$, n = 16).

we applied 40 kg N ha^{-1} less in 2020 than in 2019 according to recommendation of the French COMIFER method, the NUE in 2020 was globally lower by 27.7%. However, there were contrasting responses depending on the site: in 2019, NUE was high at site 1, intermediate at site 3 and low at site 2, while in 2020 it was higher at site 5 than at sites 4 and 6 (Figure IV.D.2D).

Furthermore, following VNT4 application we observed no consistent change in N content in the grain and straw (Table IV.D.2). Interestingly, VNT4 significantly improved total grain N by 9.8 kg N ha^{-1} (+6.1%, Table IV.D.2 and Figure IV.D.2C) and NUE by 2.2 kg kg^{-1} (+3.8%, Table IV.D.2 and Figure IV.D.2D). Indeed, total grain N was increased by VNT4 irrespective of the site and the year, from 1.3 to 19.2 kg N ha^{-1} (Figure IV.D.2C). Considering each year, it seemed that total grain N tended to increase in 2020 (+7.4%, p = 0.089, Figure 2C and Table IV.D.2). On the other hand, NUE was improved in all situations from 1.4 to 3.8 kg kg^{-1} following the application of VNT4 compared to the control (Figure IV.D.2D), and especially in 2019 (+4%, p = 0.075, Table IV.D.2). Otherwise, application of NBPT increased NUE relative to the control (p = 0.032, +2.23 kg kg^{-1}, +3.8%) in the same proportions as the VNT4 treatment (Supplementary Figure IV.D.2B).

III.2 Experiment 2: dynamics of growth, total N and N uptake using the ^{15}N labelling method

III.2.a Impacts of VNT4 on growth during the crop cycle

In order to better understand the influence of VNT4 on growth and N uptake from soil and fertilizer (^{15}N), we conducted a ^{15}N experiment at site 4 in 2020 with intermediate harvests of aerial parts after each fertilizer application. Compared to the control plots, VNT4 did not significantly change shoot biomass even though the biostimulant slightly improved it at tillering (+6.1%), stem elongation (+9.7%) and the flag leaf extended stage (+10.5%, Table IV.D.3). However, between tillering and the flag leaf extended stage, the first two applications of VNT4 significantly increased growth (+10.7%, Figure IV.D.3).

III.2.b Effects of VNT4 on total N and ^{15}N uptake during the crop cycle

In addition, the total N in aerial parts was significantly enhanced at maturity (+9.3%) due to a better accumulation of N throughout the crop cycle (Table IV.D.3). The first supply of N fertilizer (40 kg N ha^{-1}) with VNT4 increased the total N by 24.8% at tillering compared to the control, the 40 + 77 kg N ha^{-1} + VNT4 mix by 14.7% at stem elongation and VNT4

Table IV.D.3 : Agronomic and N-related traits at maturity at site 4 in 2020 (Experiment 2 with ^{15}N-labelling)

		Control	VNT4
Aerial biomass (gDW m^{-2})	**Tillering**	44.4 ± 4.0	47.1 ± 9.7
	Stem elongation	348.0 ± 64.8	381.7 ± 78.1
	Flag leaf extended	867.8 ± 77.0	958.6 ± 17.4
	Maturity	2041.9 ± 257.3	1965.1 ± 159.1
N total in aerial parts (gN m^{-2})	**Tillering**	1.57 ± 0.30	1.96 ± 0.55
	Stem elongation	8.36 ± 1.94	9.59 ± 1.65
	Flag leaf extended	9.25 ± 0.74	10.18 ± 0.91
	Maturity	14.27 ± 0.50	15.60 ± 0.21 ∗
^{15}N total in aerial parts (mgN m^{-2})	**Tillering**	6.84 ± 2.45	11.16 ± 5.06
	Stem elongation	100.00 ± 22.62	116.86 ± 19.68
	Flag leaf extended	95.84 ± 8.11	105.88 ± 7.87
	Maturity	126.22 ± 6.08	150.74 ± 9.56 ∗
Harvest Index		0.36 ± 0.07	0.39 ± 0.05
N Harvest Index		0.71 ± 0.04	0.73 ± 0.04
^{15}N Harvest Index		0.76 ± 0.04	0.80 ± 0.06

∗ denotes significant difference between control and VNT4 according to a pairwise comparison (Fisher's test, $p < 0.05$, n = 4).

applications enhanced total N by 10.0% at flag leaf stage (Table IV.D.3). Remarkably, the three applications of VNT4 allowed a significant augmentation of N accumulation in shoots between tillering and maturity (+7.3%, $p < 0.01$, Figure IV.D.3). Furthermore, this experiment showed that VNT4 significantly increased ^{15}N in aerial parts at maturity (+19.4%, Table IV.D.3), which highlights that VNT4 improved fertilizer uptake. This effect was observed after each biostimulant application: the total ^{15}N in shoots was enhanced by 6.3% at tillering, 16.9% at stem elongation and 10.5% at the flag leaf extended stage (Table IV.D.3). Interestingly, the ^{15}N uptake after the last VNT4 application, and thus during heading, flowering, and seed development, was improved by a significant 47.6% (Figure IV.D.3). This biostimulant effect throughout the crop cycle led to the significant strengthening of ^{15}N uptake between tillering and maturity (+16.9%, $p < 0.001$, Figure IV.D.3). Nevertheless, there was no significant change in terms of the HI, NHI and ^{15}NHI (+8.3%, +2.8% and +5.3%, respectively, Table IV.D.3). Therefore, the better growth with VNT4, mainly during the beginning of the cycle, allowed greater accumulation of N and ^{15}N during the entire crop cycle, and especially from fertilizer following the last VNT4 application.

III.2.c Impacts of VNT4 on elemental contents in flag leaves

To determine the effect of VNT4 applications on the mineral status of flag leaves and the relationship of this status to the level of ^{15}N uptake observed when the flag leaves were extended, 20 flag leaves were separated at the heading, flowering, seed development and maturity stages for elemental analysis. Despite a slight increase at heading (+5.3%) and a decrease during seed development (-7.8%), VNT4 did not significantly induce changes in the N concentration in flag leaves (Figure IV.D.4A). However, the S concentration was higher with VNT4 between heading and seed development, with the main effect at the heading and flowering stages relative to the control (+31.2% and +22.3%, respectively, $p < 0.05$, Figure IV.D.4B). In addition, Zn concentration was also increased by VNT4 application, especially at the flowering stage (+37.6%, $p < 0.01$, Figure IV.D.4C). Finally, the Mo concentration in flag leaves was increasingly improved until seed development following VNT4 application (Figure IV.D.4D). Indeed, the Mo concentration was strongly enhanced by VNT4 at this stage (+57.3%, $p < 0.01$, Figure IV.D.4D). Altogether, these results indicated that VNT4 biostimulant led to a higher accumulation of S, Zn and Mo in flag leaves at different stages of the crop cycle.

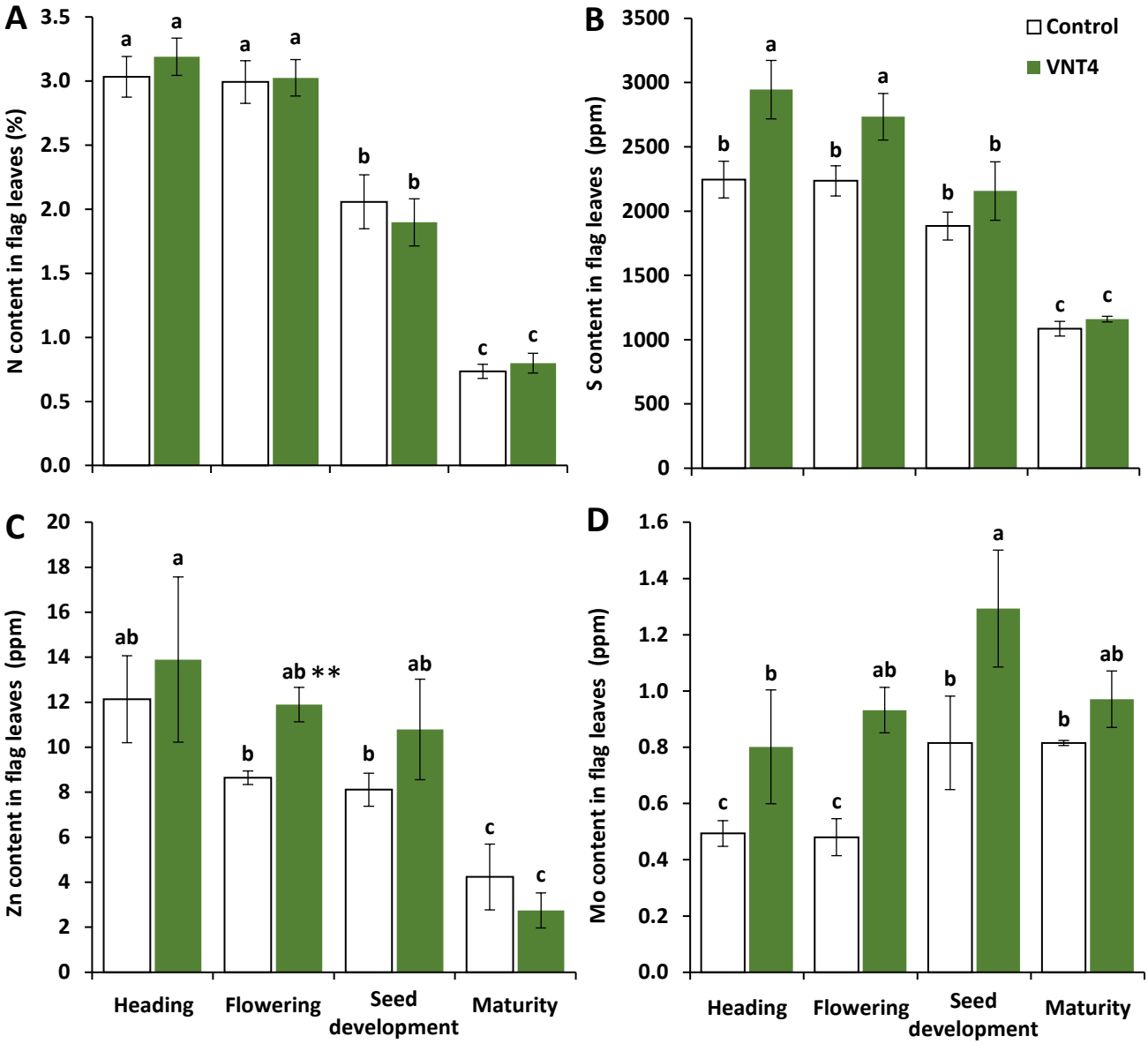


Figure IV.D.4 : Influence of VNT4 on element concentration in flag leaves of winter wheat at site 4 in 2020. (A) N concentration, (B) S concentration, (C) Zn concentration and (D) Mo concentration in flag leaves during the crop cycle. N was provided at the tillering, stem elongation and flag leaf stages. 5 L ha^{-1} of VNT4 formulation (see Table IV.D.1 for more details) were mixed with UAN before each N application, leading to a global application of 15 L ha^{-1}. Bars indicate means ± SE, different letters denote significant differences according to Fisher's test ($p < 0.05$, n = 4) and stars denote significant difference between control and VNT4 according to a pairwise comparison (Fisher's test, **; $p < 0.01$, n = 4).

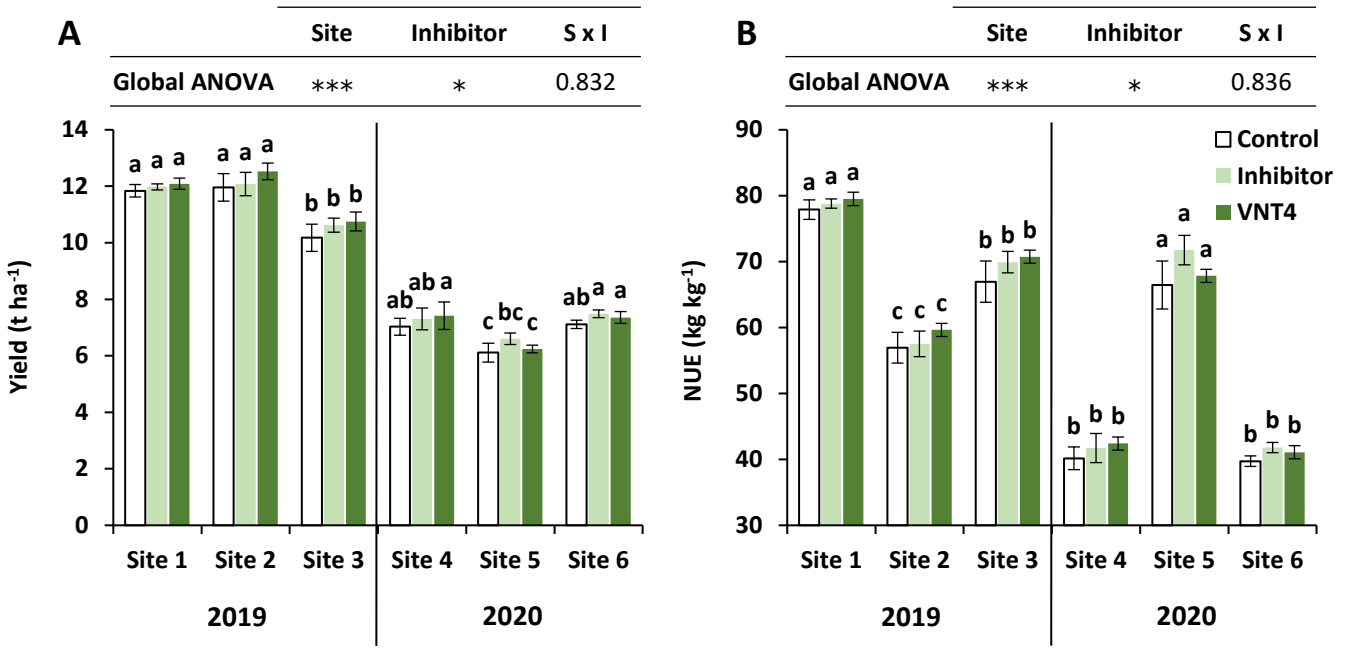
IV. Discussion

The aims of the present work were to provide a detailed picture of the effects of VNT4 on grain yield, yield parameters and N-related traits under contrasting field conditions. Clearly, our study highlighted the impacts of this biostimulant on growth, the N dynamics in aerial parts, and the element contents (S, Zn and Mo) of flag leaves and the association of these factors with improved yield, total grain N and NUE (Figure IV.D.5).

IV.1 VNT4 improved yield by increasing grain number per square metre and/or TGW despite strong year and site effects

In our study, pedoclimatic and agronomic conditions had strong impacts on yield components. Indeed, at each site the previous crop, the wheat cultivar, the sowing date, and soil properties were very different (Supplementary Table IV.D.1), inducing variability. Consequently, N fertilizer additions were managed with regard to the field properties and wheat cultivar, which led to greatly contrasted amounts of N supply (from 92 to 210 kg N ha^{-1}, Supplementary Table IV.D.2). Weather conditions were also specific to each site: the wheat crops received from 585 mm (at site 5 in 2020) to 883 mm (at site 4 in 2020) of rainfall during the crop cycle and temperatures ranged from -6.1 to 41.7°C (at site 2 in 2019, Supplementary Figure IV.D.1). The most important rainfall period for wheat is from March to June, when plants need water to grow and take up nutrients such as N. At the same time, in 2020 the wheat crops received 40 kg N ha^{-1} less fertilizer than the recommendation and 17% less precipitation than in 2019 (-36 mm during the growing period). These are the two main factors that explain the strong differences in yields and yield components between 2019 and 2020 (Figure IV.D.1).

During the two years of experimentation, we also observed a site effect each year: wheat production was lowest at site 3 in 2019 and the lowest production in 2020 was at site 5 (Figure IV.D.1A). In 2019, we applied the same amount of N at sites 1 and 3 (152 kg N ha^{-1}, Supplementary Table IV.D.2). Therefore, the low harvest at site 3 was probably due to soil type, because superficial clay limestone has less yield potential than clay loams/frank loams (Supplementary Table IV.D.1). The smaller amount of water received at site 3 may also explain this difference in wheat productivity (-32 mm compared to site 1). In 2020, the low yields at site 5 were mainly due to the small amount of N applied (92 kg N ha^{-1} while it was more than 170 kg N ha^{-1} at sites 4 and 6, Supplementary Table IV.D.2) and this site received only 152 mm



<u>Supplementary Figure IV.D.2</u> : Influence of a urease inhibitor (NBPT) and VNT4 on (A) yield and (B) N use efficiency (NUE) in winter wheat under different site and year conditions. Plant culture was carried out under six different field conditions in France, Normandy. N was provided at the tillering, stem elongation and flag leaf stages. NBPT was mixed at a concentration of 0.2% in UAN at each N application (2 ml NBPT for 1 L of UAN). The VNT4 formulation (5 L ha^{-1}, see Table IV.D.1 for more details) was mixed with UAN before each N application, leading to a global application of 15 L ha^{-1}. Bars indicate means ± SE. Different letters denote significant differences in 2019 or 2020 according to Fisher's test ($p < 0.05$; n = 3 in 2019, n = 4 in 2020).

of precipitation during the growing period (whereas it was 208 and 168 mm at sites 1 and 3, respectively).

Despite strong year and site effects on yield components, combining VNT4 with UAN enabled an improvement in grain yield, either by increasing spike number per square metre (sites 1, 3, 4 and 6) or by enhancing grain number per spike (sites 2 and 5), leading to a better grain number per square metre or a higher TGW (sites 3 and 6) (Figure IV.D.1). The effects of VNT4 were better in terms of yield in 2019 (+463 kg ha^{-1}, +4%) than in 2020 (+255 kg ha^{-1}, +3.8%). Indeed, the lowest yield amelioration by VNT4 was observed under the most suboptimal conditions: +129 kg ha^{-1} with only 92 kg N ha^{-1} and 152 mm between March and June at site 2 in 2020. Regarding soil properties, we observed the same results: there were greater increases in yield due to VNT4 in deep silt (+4.3%) than in other soils (+3.7% in clay loams, superficial clay limestone or medium limestone clay). Therefore, even though VNT4 had a positive effect on yield components irrespective of the site and the year, this biostimulant seems to be slightly more efficient under optimal conditions (i.e. higher N and precipitation). For instance, an irrigation in critical times or a larger N fertilization could result in much more yield increases by VNT4.

In order to evaluate the effect of VNT4 relative to NBPT, which is a urease inhibitor that is widely used in Europe, we performed a UAN+NBPT treatment in the six field experiments of this study: NBPT also significantly increased yield compared to the control ($p < 0.05$, +308 kg ha^{-1}, +3.4%, Supplementary Figure IV.D.2A) but there was no significant difference between VNT4 and NBPT (Supplementary Figure IV.D.2A, +51 kg ha^{-1} for VNT4). This is in agreement with a meta-analysis on the effect of urease and nitrification inhibitors that concluded that these inhibitors increased crop yields by 7.5% on average (Abalos et al., 2014). Nevertheless, their effect on yield is variable depending on the molecule used and the targeted crop. For example, several studies showed that NBPT did not improve grain yield in wheat (Grant, 2014; Nastri et al., 2000; Romero et al., 2017), even when mixed with NPPT (Li et al., 2015). In contrast, NBPT in combination with *Azospirillum brasilense* inoculation increased wheat yield by 19.6% and 18.8% with application of 100 and 150 kg N ha^{-1}, respectively (Galindo et al., 2020). Moreover, other works have demonstrated the positive impact of urease and nitrification inhibitors on wheat productivity (Chatterjee, 2018; Mohammed et al., 2016; Nikolajsen et al., 2020). Regarding CRFs, a recent meta-analysis

indicated that controlled release urea improved grain yield by 5.5% in wheat while the improvements were 8.1 and 7.4% in rice and maize, respectively (Zhu et al., 2020). On the other hand, biostimulants can enhance wheat yield by up to 17%, depending on weather conditions (optimal conditions or water-deficit stress), such as formulations based on amino acids, *Pseudomonas* strains and plant extracts (Ali et al., 2020; Karimzadeh et al., 2020; Popko et al., 2018). Application of 5-20 t ha^{-1} biochar also increased wheat grain yield by 2.9-19.4% (Sun et al., 2019). Finally, our current results are in agreement with our recent findings on Glutacetine®-based formulations, which revealed a significant effect of VNT4 on yield under controlled and field conditions (Maignan et al., 2020). Based on our previous investigations (Maignan et al., 2021, 2020), it could be hypothesized that this effect of Glutacetine® formulations on yield is mainly related to better fruiting efficiency, which in turn leads to higher grain number per spike and per square metre. Therefore, the present work confirmed that VNT4 improved wheat productivity to at least the same level as NBPT, as well as CRFs and other biostimulants, whereas it seems to be more difficult to enhance wheat performance relative to other crops (Zhu et al., 2020).

IV.2 VNT4 increased total grain N and NUE irrespective of the pedoclimatic conditions and the N supply

As described for yield components, the different weather and fertilization conditions have also impacted N-related traits at each site. In addition to the lower yields, suboptimal conditions in 2020 have resulted in the reduction of N content in grain and straw (Figure IV.D.2A and B). Interestingly, with the same N nutrition in 2019 (152 kg N ha^{-1}), wheat cultivated at site 3 had a better grain N content than at site 1, whereas the opposite was observed for straw N content (Figure IV.D.2A and B). This might be due to the contrasting N remobilization efficiency of the Sacramento (site 1) and Chevignon cultivars (site 3). Nevertheless, total grain N was the same at these two sites and NUE was lower at site 3, suggesting that N uptake efficiency was better with Sacremento (Figure IV.D.2C and D). Therefore, Sacremento may absorb more N from the 152 kg N ha^{-1} fertilizer supply to benefit yield (Figure IV.D.1A) while Chevignon may be more efficient at remobilizing N from straw towards the grain, which ultimately improved the N content in flour (Figure IV.D.2A). This highlights that differences between sites may have been due to different cultivars that can contribute towards the crop's NUE (Hawkesford and Riche, 2020), but contrasting responses may also have been due to site factors (including weather and soil).

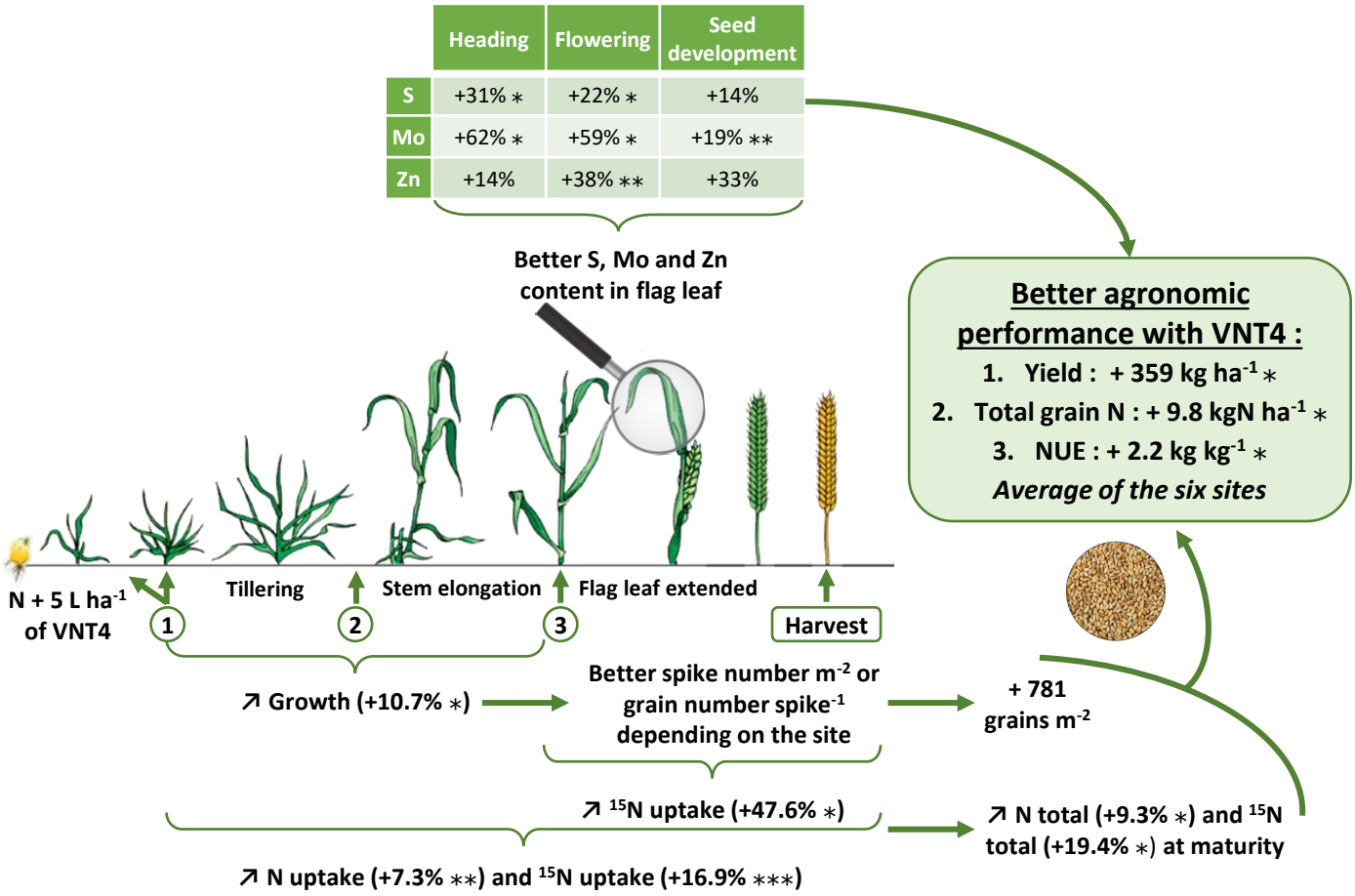


Figure IV.D.5 : Schematic model illustrating the response of wheat to VNT4 supply. Application of VNT4 along N fertilizer improved plant growth during tillering and stem elongation and induced an increase in the spike number per square metre or the grain number per spike, depending on the site. This stimulation enabled production of more grain per square metre. VNT4 also enhanced the accumulation of N and ^{15}N (especially after the last application) during the crop cycle leading to a higher N and ^{15}N total in aerial parts at maturity. In addition, application of VNT4 significantly increased the S, Mo and Zn content after the third supply at the flag leaf stage. Altogether, these responses generated better agronomic performance with higher yield, total grain N and NUE when VNT4 was applied to wheat plants.

Another way to enhance NUE is the use of biostimulants (du Jardin, 2015) like the Glutacetine®-based VNT4 formulation (Maignan et al., 2020). Indeed, in accordance with previous findings, the present study confirmed that VNT4 significantly improved total grain N and NUE, irrespective of the site and the year (Table IV.D.2). Different kinds of biostimulants, such as marine and fungal extracts, are able to increase total grain N in wheat (Laurent et al., 2020), while others (protein hydrolysate, plant extracts, *Trichoderma*) have enhanced the NUE in various plant species including tomato (*Solanum lycopersicum* L.), dwarf pea (*Pisum sativum* L.), and maize. In the same way, humic acids associated with CRF improved NUE in rice and wheat (Gil-Ortiz et al., 2020b, 2020a) and a biochar-based CRF had a similar effect in oilseed rape (Liao et al., 2020) and wheat (Sun et al., 2019). Interestingly, application of CRF alone has also enhanced the NUE of crops (Sun et al., 2020; Zhu et al., 2020). In the present study, the ^{15}N-labelling experiment carried out at site 4 in 2020 revealed that mixing VNT4 with UAN led to a higher N and ^{15}N uptake between tillering and maturity (+7.3 and +16.9%, respectively, Figure IV.D.5). Remarkably, while there was no ^{15}N uptake between the stem elongation and flag leaf stages (Figure IV.D.3) due to a lack of precipitation (only 12.4 mm during these 20 days), ^{15}N uptake was improved by 47.6% after the last VNT4 application (Figure IV.D.5). This in accordance with our previous work, which demonstrated that several Glutacetine®-based formulations stimulated post-heading N uptake (Maignan et al., 2020). Other substances, including marine and fungal extracts and CRFs, increase N uptake (Laurent et al., 2020; Zhu et al., 2020), while urease inhibitors have contrasting results in wheat (no significant impact in four out of five harvests, Krol et al., 2020). However, nitrification inhibitors (DCD and DMPP) tended to improve N uptake in the aboveground parts of the wheat plant (Liu et al., 2013). The improvement in N uptake efficiency may lead to higher total N in the plant. Application of VNT4 showed this effect with a significant increase in the total N and total ^{15}N in aerial parts at maturity (+9.3 and +19.4%, respectively, Figure IV.D.5), which is in agreement with our previous study under controlled conditions (Maignan et al., 2020).

Otherwise, from our supplemental data (Supplementary Figure IV.D.2B) it seemed that addition of NBPT increased NUE compared to the control (p = 0.032, +2.23 kg kg^{-1}, + 3.8%) as the VNT4 treatment (2.19 kg kg^{-1}, + 3.8%). It is well documented that NBPT improves NUE, but it is often a small increase in wheat compared to other crops (Abalos et al., 2014). For example, Rekowski et al. (2020) reported that urease inhibitor significantly increased NUE by 1.2 kg kg^{-}

[1] (2.3%) and total grain N by 10.5 kg N ha^{-1} (+6.5%), which is in agreement with our results. Therefore, environmentally friendly biostimulants like VNT4 had similar performance to chemical inhibitors and thus could be an alternative for the optimization of grain yield and NUE (Figure IV.D.5) in a sustainable agriculture context.

IV.3 The beneficial impacts of VNT4 are also related to the enhancement of plant growth and improvements in S, Zn and Mo contents in flag leaves

Improvement of growth is one the main effects of biostimulants (du Jardin, 2015). Indeed, the enhancement of yield and NUE by biostimulants is the result of different processes throughout the crop cycle (Yakhin et al., 2017). In our work we observed that VNT4 increased growth between tillering and stem elongation (+10.7%, Figure IV.D.5), which induced a larger spike number per square metre at site 4 in 2020 (Figure IV.D.1B). Several studies have also reported that biostimulants such as plant extracts and *Bacillus* strains enhanced wheat growth (Ali et al., 2020; Nguyen et al., 2019). Moreover, exogenous cytokinin increased leaf photosynthesis, root activity and zeatin content in tiller nodes under low N conditions, which improved tiller bud length (Yang et al., 2020). Therefore, in future investigations, it would be interesting to determine how the hormonal balance is affected by VNT4 in regard to its impact on growth and development of reproductive organs.

The strengthening of nutrient uptake efficiency could also be a beneficial outcome of biostimulant application. For example, fluorescent *Pseudomonas* strains present in the rhizosphere increase P uptake, Si or *Enterobacter* are known to improve Ca and K content, and Fyto-fitness extract has been shown to enhance the Se concentration in wheat plants (Ji et al., 2020; Karimzadeh et al., 2020; Mali and Aery, 2008; Xiao et al., 2020). In our field experiment, improvements in the S, Mo and Zn concentrations in flag leaves were observed after the last VNT4 application (Figure IV.D.5). This beneficial impact of VNT4 on the S, Zn and Mo status of the flag leaf may have some relationship with the improvement in the physiological function of this organ, which is crucial for sustaining photosynthesis as well as N assimilation and recycling in wheat (Kichey et al., 2005). Indeed, N accumulation and metabolism is controlled by other elements such as S, Mo and Zn (Imran et al., 2019a; Sun et al., 2020; Tabak et al., 2020). Several reports have provided evidence for strong interactions and between especially S and N metabolism (Coleto et al., 2017; Hesse et al., 2004; Nikiforova et al., 2005). Cysteine, which is the final product of the reductive assimilation of S, and the result of combining sulfide

with O-acetyl serine by the cysteine-synthase complex, is an amino acid that represents the convergence of N and S metabolism. Furthermore, it has been reported that S deficiency down-regulates the expression of nitrate reductase and glutamine synthase genes in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) (Migge et al., 2000). In fact, when wheat plants suffer from S deficiency, photosynthesis in the flag leaf is limited (Zörb et al., 2012), and grain yield components (Yu et al., 2018) as well as grain quality (Dai et al., 2015) are severely impacted. On the other hand, increases in the S content in wheat plants promotes greater shoot biomass and NUE (Carciochi et al., 2017). This is why S is often coupled with N fertilizers to ensure agronomic performance in a number of crops species (Poisson et al., 2019; Rossini et al., 2018; Tabak et al., 2020). Therefore, a high S content in flag leaves may contribute towards maintaining photosynthetic activity and in turn improving NUE and yield. Thus, the significant improvement in the S concentration in flag leaves by VNT4 at the heading and flowering stages balanced the N/S ratio and induced better NUE (Figure IV.D.5). This biostimulant effect on S concentration in leaves has also been reported in oilseed rape and in tomato (Ertani et al., 2015; Siwik-Ziomek and Szczepanek, 2018).

In winter wheat cultivated under different N sources, it was recently reported that Mo strengthened the photosynthetic apparatus and induced the N assimilatory pathway, increasing NO_3^- assimilation and therefore ammonium, amino acid, protein and total N contents (Imran et al., 2019b, 2019a). The increase in Mo concentration in flag leaves during seed development by VNT4 may help wheat plant to maintain photosynthesis and assimilate more N (Figure IV.D.5). This is in accordance with the recent study of Su et al. (2019), which showed that the application of the fungal endophyte *Phomopsis liquidambari* improved Mo nutrition, enhancing nitrate reductase activity and increasing growth parameters in peanut (Su et al., 2019).

Finally, Zn is one of the most important micronutrients to influence plant N homeostasis: a sufficient level of Zn in wheat improves the expression of nitrate transporter genes, amino acid concentrations and glutamine synthetase activity under low N and high N conditions, thus facilitating N accumulation (Sun et al., 2020). Besides, an adequate N supply also enhances Zn uptake and root to shoot translocation in winter wheat (Nie et al., 2019), highlighting the synergistic effect between these elements. Application of VNT4 increased Zn concentration at the flowering stage (Figure IV.D.5) while the addition of a microbially derived

organic biostimulant resulted in the enhancement of Zn concentrations in the petiole vascular system in sunflower (Tian et al., 2015). In spring wheat, *Bacillus* strains are also able to improve Zn uptake under greenhouse conditions (Nguyen et al., 2019). Therefore, the improvement in S, Mo and Zn concentrations in flag leaves may help to maintain the physiological functions of leaves and sustain growth and N uptake after the last VNT4 application, which led to enhanced total N in the shoots and higher total grain N and NUE (Figure IV.D.5).

V. Conclusions

Our work analysed the effects of VNT4, a derived formulation of Glutacetine® biostimulant, mixed with UAN on the growth, N-related traits and agronomic performance of winter wheat under six field conditions over two years in Normandy (France), including a site with ^{15}N labelling. This study has established that VNT4 mixed with UAN under contrasting field conditions leads to better yield in winter wheat by increasing spike number per square metre, grain number per spike (therefore, grain number per square metre) and/or TGW. Total grain N and NUE are also significantly improved by VNT4, irrespective of the pedoclimatic conditions. These improvements are due to better growth between tillering and the flag leaf extended stages and to higher S, Mo and Zn content in flag leaves at the heading, flowering and seed development stages. The amelioration of these physiological parameters by VNT4 permitted the uptake of more N fertilizer (+47.6%, Figure IV.D.5) in the period from the flag leaf extended stage to maturity. Thus, application of VNT4 increased the N uptake between tillering and maturity, especially N derived from fertilizer, and thus enhanced the total N in shoots at maturity. Finally, all these improvements during the crop cycle induced better agronomic performance: +359 kg ha^{-1} in yield, +9.8 kg N ha^{-1} in total grain N and +2.2 kg kg^{-1} in NUE (Figure IV.D.5). VNT4 is also more efficient under optimal conditions in wheat, a crop whose productivity is difficult to improve. Therefore, environmentally friendly biostimulants like VNT4 have similar results to chemical inhibitors when mixed with N fertilizer and thus could be an alternative to improve yield, total grain N and NUE in winter wheat in a sustainable agriculture context.

Author contributions

Conceptualization, V.M., P.G. and J-C.A.; methodology, V.M. and J-C.A.; software, V.M.; validation, V.M. and J-C.A.; formal analysis, V.M.; investigation, V.M., R.C. and J.-C.A.;

resources, V.M., P.G. and J.-C.A.; data curation, V.M. and R.C.; writing—original draft preparation, V.M. and J.-C.A.; writing—review and editing, V.M. and J.-C.A; visualization, V.M.; supervision, P.G. and J.-C.A.; project administration, V.M., P.G. and J-C.A.; funding acquisition, V.M., P.G. and J-C.A.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research and the APC were funded by ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie), which has supported this work as part of a PhD thesis (CIFRE 2017/1239), and by the Région Normandie and FEADER, which supported the FIELD-Prot project (EIP-AGRI).

Acknowledgments

The authors deeply thank Régis Vecrin, Pierre-Vincent Protin and Frédéric Cardon for their involvement in this work and their valuable advice. The authors acknowledge Laetitia Mabire, Marine Louargant, Thibaut Chouanneau, Romain Laureau, Thomas Simon and Olivier Rose for helping with plant culture, measurements and harvesting. We are most grateful to the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for all the elemental analyses done by IRMS and the HR ICP-MS used in this study. We thank Laurence Cantrill for improving and correction of the English in the manuscript.

E. Evaluation d'un système NIRS portable sur la feuille drapeau au stade floraison pour la prédiction de la teneur en N du grain et des composantes de rendements chez le blé tendre

Cet article sera soumis en mai 2021 à Field Crops Research

Contexte : L'optimisation de l'efficience d'usage de l'azote (EUA) est un enjeu majeur pour maximiser les performances agronomiques des céréales et limiter les pertes dans l'environnement. Dans un contexte de développement durable, l'utilisation d'outils de diagnostic permettant d'optimiser la fertilisation azotée (N) s'est développée ces dernières années. Compte-tenu de l'intérêt de la spectrométrie proche infrarouge (NIRS) pour évaluer différents critères d'intérêt agronomique, une expérimentation a été conduite afin d'étudier le potentiel de cet outil pour déterminer la teneur en N et les composantes de rendement du blé tendre d'hiver.

Objectif : Cette étude réalisée à partir d'échantillons de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) issus de trois conditions pédoclimatiques contrastées vise à calibrer l'outil LabSpec® (ASD Inc.) pour prédire la teneur en N des feuilles drapeaux et des grains matures ainsi que les composantes du rendement (PS et PMG) à partir de spectres NIRS réalisés sur les feuilles drapeaux et sur les grains matures.

Démarche expérimentale : Trois variétés de blé tendre d'hiver ont été cultivées dans trois parcelles normandes ayant des caractéristiques pédoclimatiques contrastées en 2019-2020. Sur chacun des sites, plusieurs modalités de fertilisations ont été appliquées : témoin non traité, condition sous-optimale, condition sous-optimale ayant reçu des biostimulants, conditions optimales et sur-fertilisation. Des mesures de spectre NIRS ont été réalisées sur la feuille drapeau aux stades épiaison, floraison et post-floraison et sur les grains matures. Puis ces échantillons ont été analysés par IRMS et des corrélations entre les spectres NIRS ayant subis différents pré-traitements et les données biochimiques ont été réalisées.

Principaux résultats : Ce travail a permis d'élaborer plusieurs calibrations permettant de prédire différents critères d'intérêt agronomique. Tout d'abord, à partir de mesures NIRS réalisées sur feuille drapeau fraîche, il a été possible de prédire la teneur en N des feuilles drapeaux quel que soit le stade. La détermination de la teneur en N des grains matures, du PS et du PMG a aussi été possible grâce aux spectres NIRS réalisés sur les grains entiers. Enfin, la prédiction du PS et du PMG et dans une moindre mesure du rendement et de la teneur en N du grain peut se réaliser grâce à des spectres NIRS pris sur des feuilles drapeaux au stade floraison. Même s'ils doivent être confirmés sur d'autres génotypes et dans des environnements variés, ces développements de la technologie NIRS sont prometteurs et pourront contribuer (i) à un meilleur pilotage des apports azotés et (ii) à l'évaluation de fertilisants innovants ou de biostimulants pouvant optimiser les rendements, l'EUA, le bilan agro-environnemental et/ou la qualité du grain de blé.

E. Assessment of portable NIRS measurement on flag leaf at flowering stage for the prediction of grain N and yield components in bread wheat

Raphaël Coquerel [1,†], Victor Maignan [1,2,†], Philippe D'Hooghe [1,3], Pierre Roumet [4] and Jean-Christophe Avice [1]

[1] Normandie Univ, UNICAEN, INRAE, UMR EVA, SFR Normandie Végétal FED4277, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen, France

[2] Via Végétale, 44430 Le Loroux-Bottereau, France

[3] SILEBAN (Station d'expérimentation et de développement légumière de Normandie), 19 route de Cherbourg, 50760 Gatteville-Le-Phare, France

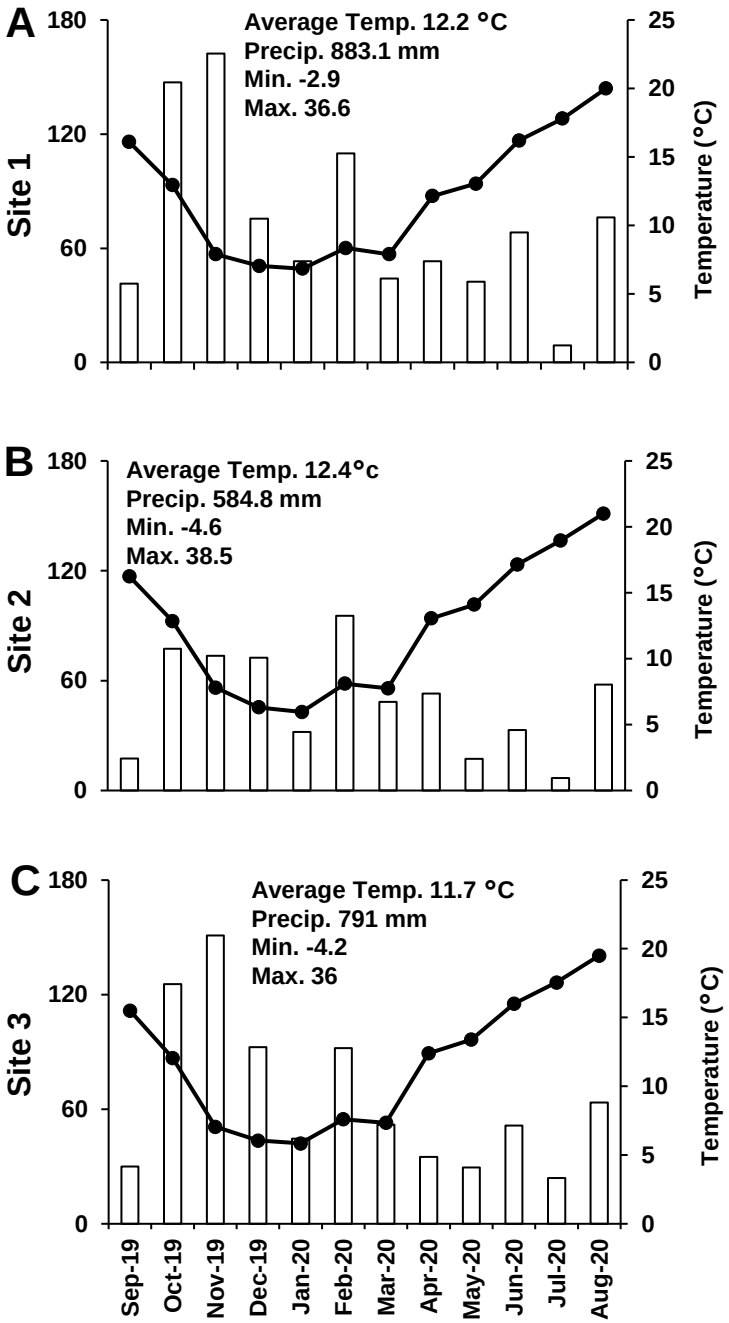
[4] AGAP, Université de Montpellier, CIRAD, INRAE, L'institut Agro, Montpellier, France

[†] These authors have contributed equally to this work.

Keywords: Non-destructive tool, non-invasive tool, near-infrared spectroscopy, leaf nitrogen content, bread wheat, grain quality

Abstract

Flag leaf nitrogen (N) status is determinant for grain filling in bread wheat (*Triticum aestivum* L.), which is a major global crop. Indeed, N content in flag leaves strongly influenced N content in grain, yield components and grain yield. In the present work, individual flag leaves (harvested at heading, flowering, and seed development stages) and mature grains from three contrasting sites in Normandy (France) were scanned with a portable spectrometer and reference analyses of N content were then carried out. N content in flag leaves and in grain were calibrated to near-infrared (NIR) spectra taken in these organs. In addition, predictions of specific weight (SW), thousand grain weight (TGW) and grain yield were determined from NIR spectra measured on fresh flag leaves at flowering stages and on mature grains. After using different pre-treatments, partial least square regression (PLSR) was performed for calibration and cross-validation. N content was accurately predicted for both flag leaves (irrespective of the stage) and mature grains (R^2_{cv} = 0.86 and 0.78, respectively) while SW and TGW were predicted from grain spectra with R^2_{cv} = 0.72 and 0.66, respectively. Moreover, flag leaves spectra taken at flowering allowed the prediction of N content in grain (R^2_{cv} = 0.22), grain yield (R^2_{cv} = 0.41), TGW (R^2_{cv} = 0.64) and SW (R^2_{cv} = 0.65). In addition, this tool provides



<u>Supplementary Figure IV.E.1</u> : Weather conditions for each site during the growing period. (A) Site 1, (B) Site 2 and (C) Site 3.

a relevant and non-destructive measurement for the screening of innovative N fertilizers and biostimulants that are able to optimize N use efficiency, grain yield and quality of bread wheat.

I. Introduction

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) popularity and success can mainly be attributed to its high grain yield and specific flour characteristics (Zörb et al., 2018). In addition, this crop can be grown in many areas with different climate, elevation, and soil properties. This is why wheat grain is the most versatile grain among the cereals used for food, supplying more proteins and calories to the global population than any other crop (Shewry and Hey, 2015). Nevertheless, environmental conditions (soil type, atmospheric CO_2 concentration and weather conditions), genetics and agrotechnical factors (such as crop rotation, culture management and fertilization) and their interactions determine wheat yield potential (Curtis and Halford, 2014).

Among these factors, application of mineral fertilizer in crops is one of the most significant changes of agricultural modernization of the 20th century. Indeed, mineral fertilizers play a significant role in replenishing shortages of nutrients for plants and improving crop productivity (Lu and Tian, 2017). Among nutrients, nitrogen (N) is a major limiting nutrient for maintaining crop yields and quality (Zörb et al., 2018). As a result, N fertilizer is usually applied in large amounts to increase agricultural production around the world and take part in the self-sufficiency in food production in many developing countries (Lassaletta et al., 2019). However, N is a major limiting factor for sustainable and profitable crop production. It has been estimated that only one third of applied N is used by wheat (Hawkesford and Riche, 2020b), indicating that about 67% of N fertilizer applied for crop production might not be recovered in the grain. Indeed, excessive N application through fertilizers and manures can degrade soil and environmental quality by increasing soil acidification, nitrate (NO_3^-) leaching, emissions of ammonia (NH_3) and nitrogen oxide (NO, N_2O, and NO_2) gases (Mateo-Marín et al., 2020; Räbiger et al., 2020). Among them, N_2O is a highly potent greenhouse gas (GHG) that contributes to global warming (Franzluebbers, 2007; Herrero et al., 2010). While the unsuitable management of N fertilization may reduce yield and lead to decrease grain quality (Rossini et al., 2018), it is necessary to improve N use efficiency (NUE) in wheat (Aula et al., 2020; Cormier et al., 2016). Therefore, optimizing the use of N fertilizers is important since a

<u>Supplementary Table IV.E.1</u> : Management of N fertilization for the three field experiments

Variant	Site 1	Site 2	Site 3
Humus effect	40	35	25
Previous crop effect	20	20	20
Organic matter supply effect	0	0	0
N uptook	0	15	20
N residue (NO_3^-/NH_4^+)	30 (26/4)	39 (28/11)	24 (21/3)
Total N soil supply (kg N ha^{-1})	90	109	89
Crop needs	285	234	288
N remaining	20	15	20
Total N needs	305	249	308
N fertilization (optimal)	215	132	219
Supply 1	40 + 77	60	106
Supply 2	58	32	53
Supply 3	40	40	60

high NUE ensures economic sustainability of cropping systems and suitable plant production and at the same time reduces environmental threats caused by N supply.

To manage N, one of the most notable progress is the determination of a critical N dilution curve for winter wheat (Justes et al., 1994), highlighting that wheat needs a sufficient level regarding N content for optimal plant growth. Concomitantly, JUBIL method, which is based on nitrate content of the base stem juice, was developed in order to estimate N wheat status at the whole plant level regarding the critical N dilution curve (Justes et al., 1997). In the last decades, improvement of NUE *via* optical sensors has gained attention, with the focus of optimizing N input while simultaneously sustaining grain yield and quality (Aula et al., 2020). For example, SPAD-502® chlorophyll meter appeared in the late 90s (Konica Minolta Inc., Tokyo, Japan). This tool is based on an optical determination (measure of leaf transmittance at two wavelengths) of the chlorophyll content of a leaf to estimate the N status of the whole plant. SPAD-502® is now widely used to optimize NUE in wheat (Bijay-Singh and Ali, 2020; Ravier et al., 2017; Silva-Pérez et al., 2020). This tool is also used to estimate wheat grain protein content with a measurement on leaf at flowering (Aranguren et al., 2021). Therefore, other leaf clip based on fluorescence have been developed such as Dualex® (Force-A, Orsay, France) (Cartelat et al., 2005; Tremblay et al., 2009; Upreti et al., 2019). Dualex® measures chlorophyll content by analyzing the fluorescence emitted through the leaf and estimates flavonols and anthocyanins contents in leaves which are good indicators of plant-light interaction. With these three indicators of plant status, a N balance index (NBI®) is calculated, which is directly correlated with N content in leaf (Quemada et al., 2014). Nevertheless, estimation of N status by these non-destructive chlorophyll meters may vary depending on the area of the leaf analyzed. For instance, in senescent leaves, the level of chlorophyll is very low or null while the level of N could be still significant especially in case of low N remobilization. In addition, there is a threshold for N content (above 125 mmol m^{-2}) for what the relationship between leaf N level is not inferred from chlorophyll content. This is why other onerous techniques, such as method based on deep features from near infrared hyperspectral imagery coupled with spectral features, were developed to estimate leaf N status (Yang et al., 2021).

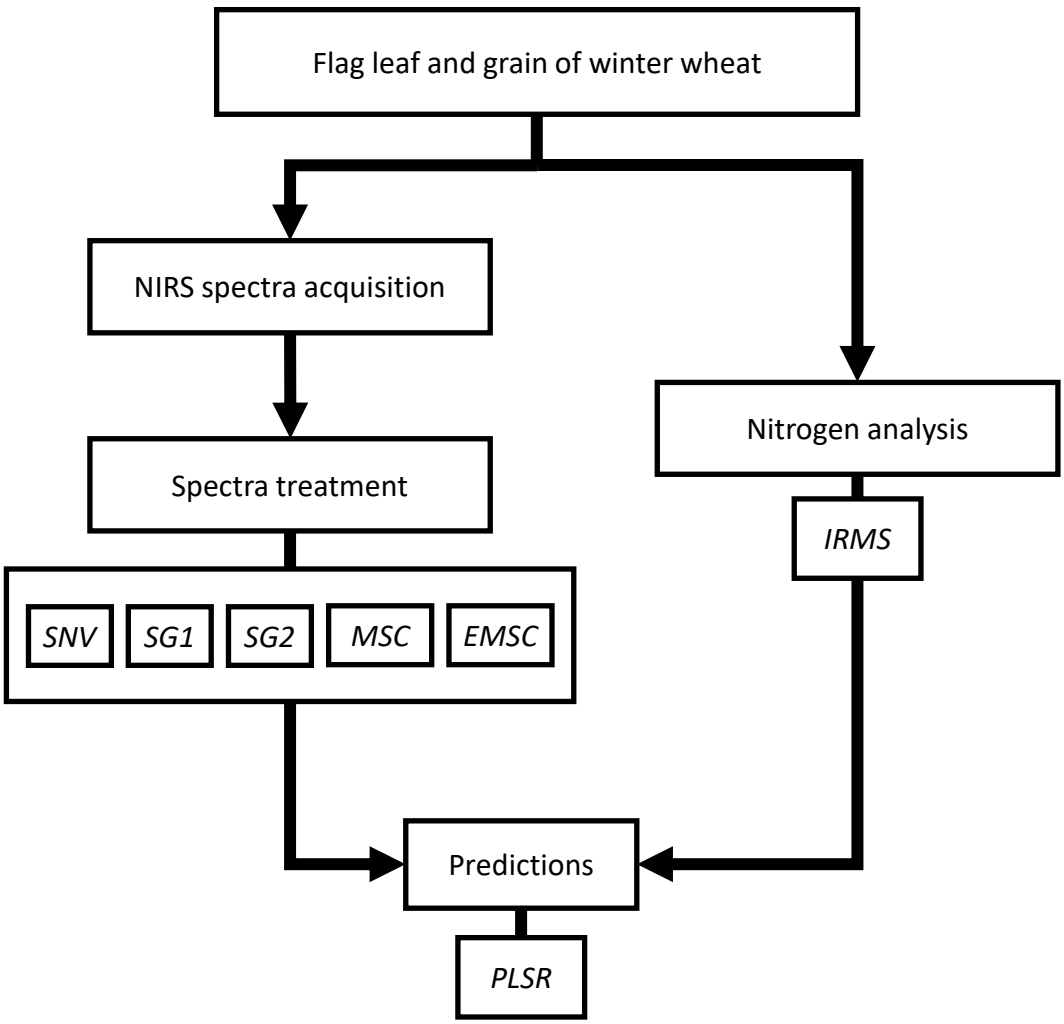
Another non-destructive and fast alternative to measure N content (without being based solely on chlorophyll/N relationships) in leaf is near-infrared spectroscopy (NIRS), which

	Site 1	Site 2	Site 3
Location	49.249615, -0.612199	48.865838, 0.021099	48.829081, 1.230917
Soil type	Deep silt	Medium limestone clay	Deep silt
Wheat cultivar	Adoration	Extase	Boregar
Previous crop	*Beta vulgaris*	*Brassica napus*	*Brassica napus*
Sowing date	28/12/2019	25/10/2019	10/10/2019
Harvest date	05/08/2020	24/08/2020	27/07/2020
N input (kg N ha^{-1})	215	219	138
pH (water)	6.9	8.1	7.4
Organic matter (%)	1.6	4.1	2.4
Total N in the soil (%)	0.09	0.27	0.10

<u>Figure IV.E.1</u> : Summary of three field trials carried out on winter bread wheat during the 2019-2020 season. These experiments were located in Normandy in three different pedoclimatic contexts (France).

uses a wide range of wavelengths (wider than previous techniques) and is compatible with the development other portable tools (Ecarnot et al., 2013). Chemometrics is a technique to find correlation between spectral characteristics and different physiological, biochemical, or technological traits by establishing the model between the reference values and spectral data (Mabood et al., 2017). Several studies demonstrated that NIRS coupled with chemometric analysis could be useful to estimate wheat grain quality such as protein content (Delwiche, 1998), amino acid profile (Fontaine et al., 2002), phenolic content (Tian et al., 2021), milling and baking parameters (Jirsa et al., 2008) and gliadin content (García-Molina et al., 2016). NIRS is also developed to assess N content in leaf (Ecarnot et al., 2013) especially during grain filling in durum wheat (Vilmus et al., 2014). To achieve a robust calibration and allow accurate and precise predictions for predicting N content in wheat leaf, it is necessary to couple the use of enlarged reflectance spectra with chemometric analysis (especially the method of partial least square regression, PLSR) (Zhao et al., 2012). Moreover, it is also well documented that N content in flag leaf is strongly correlated with grain yield and N content in grain (Lopes et al., 2006; Luo et al., 2018; Sexton et al., 2006) especially at flowering stage (Bogard et al., 2011; Sexton et al., 2006; Taulemesse et al., 2015). All these results suggest that NIRS spectra from flag leaf at flowering stage could be used as a promising tool to compute robust prediction of grain yield and characteristics. Among yield parameters, thousand grain weight (TGW) is the only one which is determined after flowering stage and dependent on flag leaf status (Rivera-Amado et al., 2020). Regarding grain characteristics, specific weight (SW) and N content (this value being multiplied by the factor 5.7 to obtain an estimation of protein content) influence the market value of wheat grain (Hoyle et al., 2019; Wrigley and Batey, 2012).

Therefore, the aim of this study was (i) to calibrate NIRS tool in order to measure N content in flag leaf at extended ages (heading, flowering, and seed development) and in mature grain of bread wheat, and (ii) to predict grain yield and grain characteristics (N content, SW, and TGW) from measurements obtained in mature grains and in an original way from reflectance data obtained in fresh flag leaves at flowering stage. The calibrations were carried out on *Triticum aestivum* L., including three different cultivars which grew under contrasting pedoclimatic and N fertilization conditions, in order to have a wide range of data and an efficient tool suitable for various field conditions.



<u>Figure IV.E.2</u> : Flow chart of NIRS calibration explaining step by step how predictions can be made with a NIRS analysis. Spectra were processed by standard normal variate (SNV), Savitzky-Golay of order 1 (SG1), Savitzky-Golay of order 2 (SG2), Multiple Scatter Correction (MSC), Extended Multiple Scatter Correction (EMSC). In parallel, all samples were analyzed by IRMS (isotope-ratio mass spectrometry) for N content. Predictions were then made by PLSR (Partial Least Square Regression).

II. Materials and methods

II.1 Field experiment design

In 2019, three cultivars of winter bread wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Boregar, cv. Adoration and cv. Extase) were sown during autumn at three different sites in Normandy (France), which is classified as having an oceanic temperate climate (Figure IV.E.1). Plot size was 24 m² (12 m x 2 m) and four replicates (plots) were used per treatment at each site. Experimental design was the randomized complete block design with four main blocks. During the growing period, systematic applications of plant protection treatments were carried out. Weather conditions (average temperature and total rainfall) were from 11.7 to 12.4°C and from 585 to 883 mm between September 2019 to August 2020 (Supplementary Figure IV.E.1). Previous crops and soil properties were very different at each site (Figure IV.E.1).

N fertilization was intended to replicate the usual farmer practices and was calculated using the so called “Méthode du Bilan” (“The N balance method”) described by the French COMIFER committee (Comité français d’étude et de développement de la fertilisation raisonnée, 2000). This method is based on the determination of the amount of mineral N in the soil in February (end of winter) to estimate total soil N supply. With the estimation of total plant needs, the method allows application of an N dose that is close to the crop demand (Supplementary Table IV.E.1). In our field experiment, 33.5% ammonium nitrate fertilizer was used to fertilize independent plots. Depending on the crop demand, N fertilization was applied at different level at each site: no fertilization, sub-optimal fertilization (optimal fertilization - 40 kg N ha^{-1}), optimal fertilization (Supplementary Table IV.E.1), and over-optimal fertilization (optimal fertilization + 40 kg N ha^{-1}). In addition, several treatments based on Glutacetine® and formulations derivated from this biostimulant that are able to enhance NUE (Maignan et al., 2020), were applied with 46% urea and 39% urea-ammonium-nitrate solution on others plots (under sub-optimal fertilization) for a total of 48 independent microplots at each site. These different fertilizer forms and amounts of N applied (from 0 to 259 kg N ha^{-1}) led to a wide range of N content in flag leaf and in grain, and thus to diverse grain yields. The first fertilization was applied at tillering (BBCH 20-25), the second at stem elongation (BBCH 31, sub- and over-optimal conditions were applied at this stage), and the last at flag leaf stage (BBCH 39, Supplementary Table IV.E.1). For the last N application, we followed the new N requirement indicators (“bq” coefficient) for growing each bread wheat cultivar with the dual

Supplementary Table IV.E.2 : Summary of the results obtained by the PLS prediction model for all relationships.

		SNV	SG1	SG2	MSC	EMSC
Flag leaf spectra (all stages) / N content in flag leaf	**Number of components**	7	7	9	8	7
	$RMSE_{CV}$	0.36	0.34	0.29	0.36	0.34
	R^2_{CV}	0.77	0.81	0.86	0.78	0.82
Flag leaf spectra at flowering / Grain yield	**Number of components**	1	1	1	1	1
	$RMSE_{CV}$	0.53	0.49	0.49	0.53	0.47
	R^2_{CV}	0.16	0.37	0.35	0.16	0.41
Grain spectra at maturity / N content in grain	**Number of components**	7	7	2	7	7
	$RMSE_{CV}$	0.09	0.1	0.1	0.08	0.09
	R^2_{CV}	0.7	0.64	0.54	0.78	0.66
Grain spectra at maturity / Specific weight	**Number of components**	6	3	2	6	4
	$RMSE_{CV}$	0.67	0.61	0.63	0.66	0.64
	R^2_{CV}	0.72	0.7	0.68	0.71	0.69
Grain spectra at maturity / Thousand grain weight	**Number of components**	5	3	3	5	6
	$RMSE_{CV}$	1.9	2	2	1.8	1.8
	R^2_{CV}	0.63	0.58	0.58	0.64	0.66
Flag spectra at flowering / N content in grain	**Number of components**	5	3	2	5	3
	$RMSE_{CV}$	0.12	0.11	0.11	0.12	0.11
	R^2_{CV}	0.18	0.22	0.22	0.17	0.17
Flag spectra at flowering / Specific weight	**Number of components**	5	3	4	5	5
	$RMSE_{CV}$	0.62	0.66	0.62	0.62	0.64
	R^2_{CV}	0.65	0.59	0.64	0.65	0.59
Flag spectra at flowering / Thousand grain weight	**Number of components**	5	4	3	5	3
	$RMSE_{CV}$	1.5	1.5	1.6	1.5	1.5
	R^2_{CV}	0.55	0.64	0.54	0.54	0.61

objective of optimum yield and grain protein content in line with the market requirements (Cohan et al., 2019).

At heading, flowering, and seed development stages, 20 flag leaves per plot were separated for NIRS and N analysis. At maturity, grains were collected using a combined harvester for determination of yield, N content and different yield components. After harvesting of winter wheat, TGW (g), SW (specific weight or test weight corresponding to grain density and expressed as kg hl^{-1}) and moisture (% dry matter) were determined. Grain yields were then calculated with a standard moisture (15%). All samples were then dried in an oven (60°C) for 48 h and ground to a fine powder using Retsch MM200 mixer mill (Eragny sur Oise, France) for N analysis.

II.2 N analysis by IRMS

For N analysis in flag leaves and grain (Figure IV.E.2), aliquots of each dried sample were placed into tin capsules using a microbalance and the total N concentration was determined with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Horizon, NU Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy).

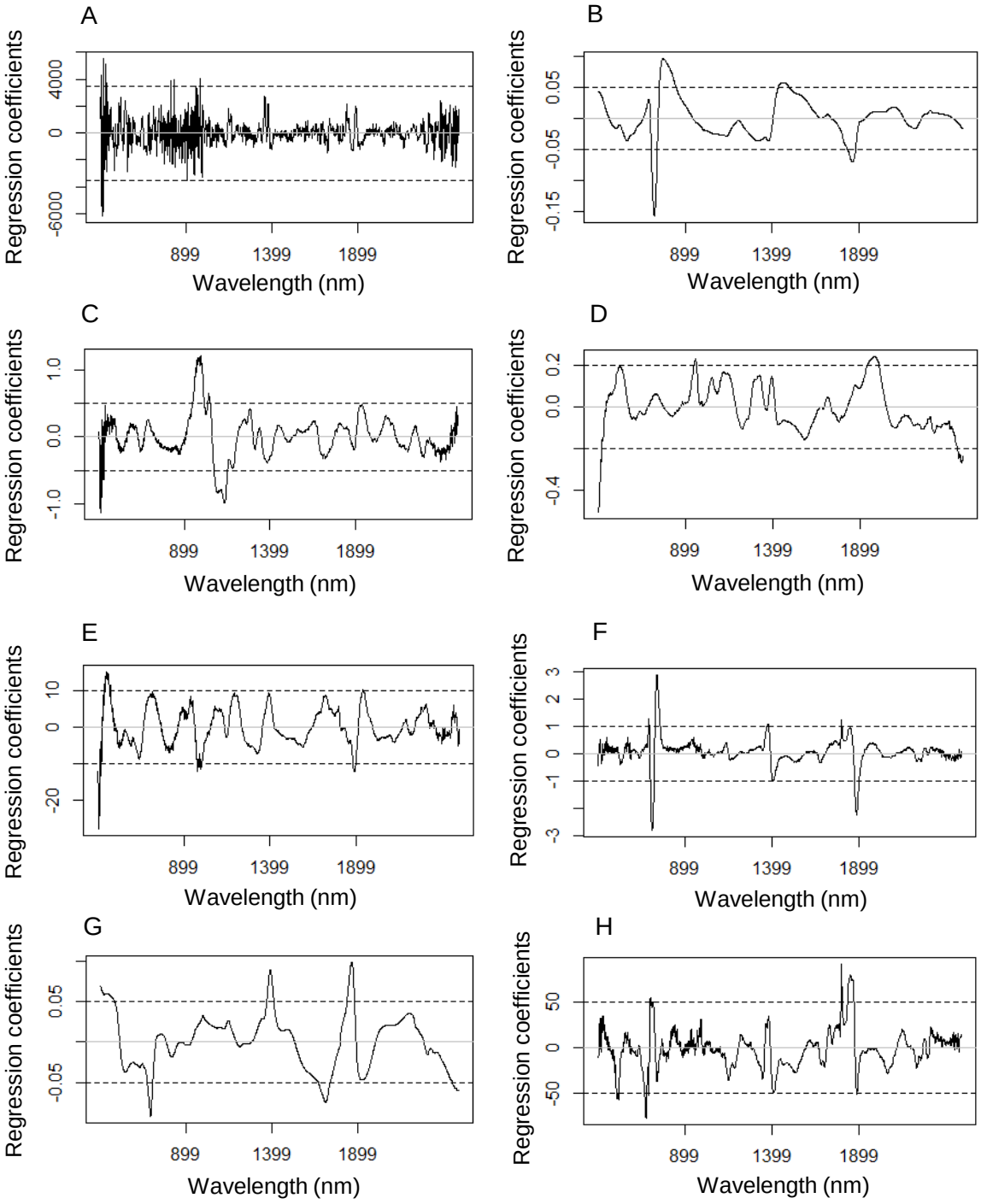
II.3 Near infrared spectra acquisition

Flag leaves and grains spectra were obtained with a LabSpec 4 Standard-Res Lab Analyzer (Analytical Spectral Devices, Inc., ASD, Boulder, CO, USA) used with a contact probe for the grains and coupled with leaf clip for the leaves. The spectral range of the spectrometer was 350-2500 nm and spectral resolution varied from 3 nm for the 350-1000 nm (VNIR sensor) region to 10 nm for the 1000-2500 nm (SWIR sensor) region. The spectrum was obtained by interpolation in 1 nm steps. For leaves, we recorded reflectance spectra at heading, flowering, and seed development stages and for grains, reflectance spectra were obtained at maturity. All spectra were obtained from fresh and intact samples (Figure IV.E.2).

II.4 NIRS calibration development

II.4.a Sample preparation and reference data set

A set of 144 grain samples and 432 leaf samples were used in this work. To create the PLSR models for correlation between flag leaves spectra and N content in flag leaves, all spectra acquired during the 2019-2020 field trials were used (i.e., heading, flowering, and seed development stages). Leaves were divided into a calibration and a validation dataset: i.e., 216



<u>Supplementary Figure IV.E.2</u> : Evolution of the regression coefficients as a function of wavelengths for N content in flag leaf predicted by flag leaf spectra at all stages (processed by SG2) (A), yield predicted by flag leaf spectra at flowering (processed by EMSC) (B), N content in grain predicted by grain spectra at maturity (processed by MSC) (C), specific weight (SW) predicted by grain spectra at maturity (processed by SNV) (D), thousand grain weight (TGW) predicted by grain spectra at maturity (processed by EMSC) (E), N content in grain predicted by flag leaf spectra at flowering (processed by SG1) (F), SW prediction by flag leaf spectra at flowering (processed by SNV) (G) and TGW predicted by flag leaf spectra at flowering (processed by SG1) (H).

leaves were used for the calibration of N content in flag leaves and, 216 other leaves to validate the model. For correlation between flag leaves and grain traits, only spectra acquired at flowering stage were used because the model was less robust with spectra acquired at heading or seed development stage (data not shown). As before, data were divided into an equal calibration and validation dataset. Both were composed by 72 flag leaves spectra. The calibration set was composed by the first and third blocks of each site, and the prediction set was composed by the second and fourth blocks of each site. We used the same method for correlation between mature grains and all grain characteristics.

For the first step, the noisy part of spectra between 350 nm and 400 nm was removed. Gaps due to switching between the three different detectors (at 1000 and 1800 nm) were then corrected by fitting a straight line to 10 points before the switch and using this line to estimate the value immediately before the switch. Gaps correspond to less than 5% of the reflectance. Then, spectra underwent pre-treatments to reduce or remove the nuisance variability sources. Pre-treatment methods consist of baseline correction, scattering correction and smoothing. Standard normal variate (SNV) was used to eliminate the scattering effects of the spectrum (Figure IV.E.2). Savitzky-Golay smoothing (SG) performed a piecewise polynomial (order 1 and 2) fitting with specified width and order to the spectrum, which is able to eliminate the spectral noise and improve the signal to noise ratio (SNR) of the spectral signal (Figure IV.E.2). Multiplicative scatter correction (MSC) and extended multiplicative scatter correction (EMSC) methods were used to linearize each spectrum into the ideal spectrum of the sample to eliminate the effects of scattering (Figure IV.E.2).

II.4.b Prediction model

Spectra obtained previously were used to build a prediction model. However, there is a problem of high multicollinearity among the predictors when a regression model for spectra data is building. The well-known calibration tool based on PLSR was used to solve this problem as it adopts the chemical data in determining how regression factors are calculated from the spectroscopic data matrix, thereby reducing the impact of irrelevant variables in the calibration model (Figure IV.E.2).

For a given descriptor data X and response data Y, the PLSR can be expressed as: $Y = Xb + f$, where b is a vector of regression coefficients and f the residual matrix for modelling. In PLSR, the estimate of vector b depends on the number of components used in the

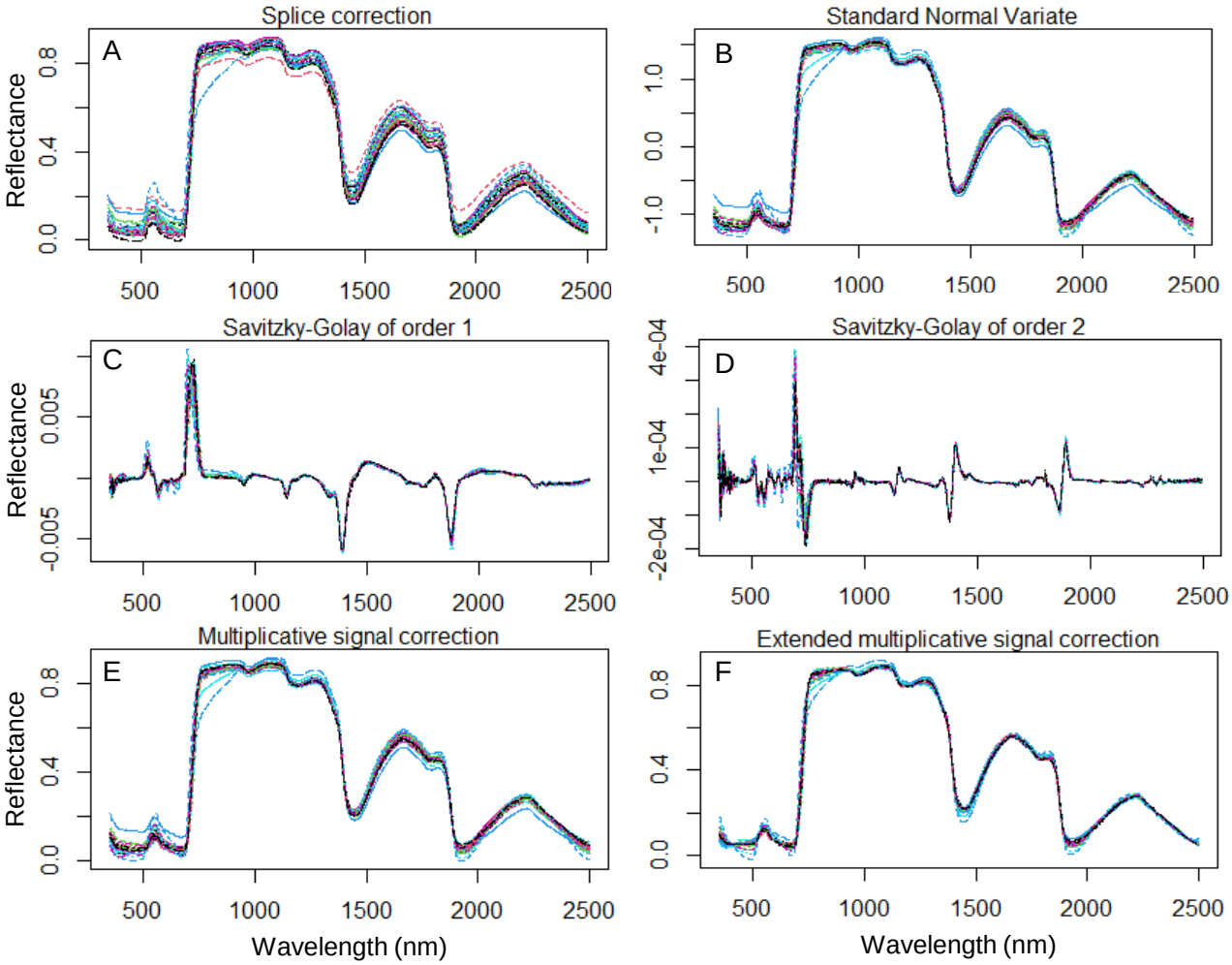


Figure IV.E.3 : Different treatments applied on flag leaf spectra observed at all stages for all sites. Splice correction spectra (A), Standard normal variates (B), Savitzky-Golay of order 1 (C), Savitzky-Golay of order 2 (D), Multiplicative signal correction (E) and Extended multiplicative signal correction (F).

modelling. The optimal number of components used for each PLSR modal was selected by internal cross validation.

II.4.c Elimination of outliers

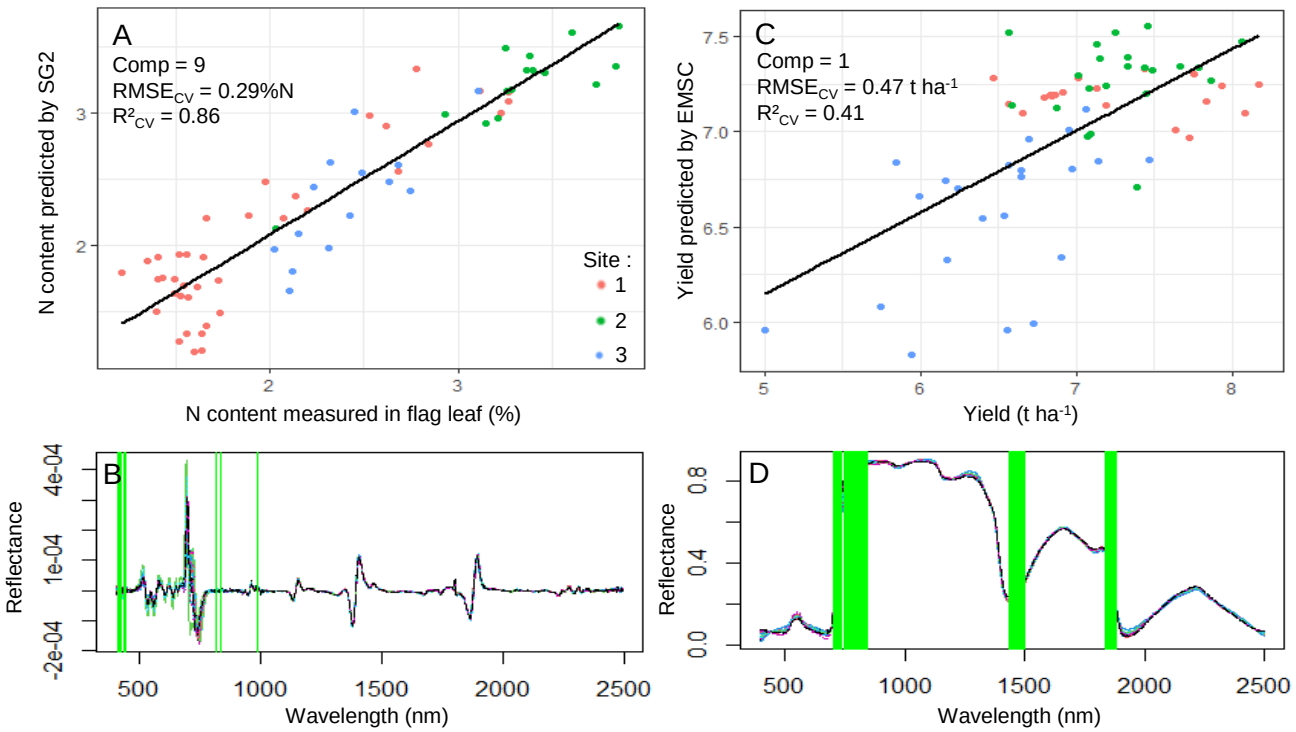
Because the quality of a calibration model is determined by that of the calibration data, outlier detection in multivariate calibration was performed using Cook's distance method. The aim of this method was to detect influential points in regression coefficients. Indeed, Cook's distance method is a general method for assessing the local influence of single data point against least squares regression analysis. Eight spectra out of 216 (i.e., 3.7%) were eliminated from the data set used for the N content calibration and 5 spectra out of 144 (i.e., 3.5%) were removed from the data set used for the grain quality calibration.

II.4.d Validation and correlation

The prediction set corresponding to 72 samples for grains and 72 or 216 samples for N flag leaves, was used to validate the prediction models obtained previously. Values generated by the prediction model were compared to the measured values. The performance of the prediction model was evaluated by the R^2_p (coefficient of determination of the calibration) and $RMSE_p$ (root mean square error). R^2_p ranges from 0 to 1, and the closer it is to 1, the better the prediction model. $RMSE_p$, which gives information about the adjustment of the model to the calibration data (the lower the better), was calculated considering the number of samples, the results of the reference analysis and the estimated results by the NIRS. Generated and measured values were both plots to observe the correlation between them. For each calibration, all pre-treatments were tested (Supplementary Table IV.E.2), and the best pre-treatment was retained (i.e., the higher R^2_{cv} with the lower $RMSE_{cv}$). To observe the wavelengths most involved in the model, the regression coefficient applied to them was also plotted (Supplementary Figure IV.E.2).

II.4.e Software

All analyses carried out on spectra were performed using R (GNU GPLv2, version 4.0.2, 2020-06-22; R Core Team, 2020). The prospectR and e1071 packages were used to perform spectra pre-processing and the MSC, respectively (Meyer et al., 2021; Stevens and Ramirez-Lopez, 2020). The pls package was used for performing the PLSR analysis (Mevik et al., 2013) and the ggplot 2 package was used for generating plots (Wickham, 2016).



<u>Figure IV.E.4</u> : Relationship between prediction obtained by flag leaf NIRS spectra processed by Savitzky-Golay of order 2 (SG2) and N content in flag leaf at all stages (heading, flowering and seed development) (A) and different wavelengths (green) recruited from SG2 spectral database involved in the model (B). Relationship between flag leaf NIRS spectra at flowering processed by extended multiple scatter correction (EMSC) and yield (C) and different wavelengths recruited from EMSC spectral database involved in the model (D). Plant culture was carried out under three different field conditions in Normandy (France): data from site 1 (red), site 2 (green) and site 3 (blue) are given in A and C (details about the experimental sites were given in Material and methods). N fertilization was provided at tillering, stem elongation and the flag leaf stages. Comp: number of components; $RMSE_{cv}$: root mean square error (cross validation) ; R^2_{cv}: coefficient of determination of the calibration (cross validation).

III. Results

III.1 Description of the spectra

Reflectance spectra obtained on flag leaves at all stages of development (heading, flowering, and seed development) were compiled in Figure IV.E.3. Spectra showed in Figure IV.E.3A were obtained after correcting the sensor splices at 1000 nm and 1800 nm. These spectra were used as the basis for all the pre-processing (Figure IV.E.3B to F). Photosynthetic pigments absorbed light in the visible region (400-700 nm, Figure IV.E.3A). The 800-1100 nm region is generally characterized by high levels of reflectance and all the leaves analyzed in our work presented this characteristic (Figure IV.E.3A). As expected, absorbance bands were also observed in the 1100-2500 nm region mainly due to the influence of starch (1440 nm), water (1300-1500 and 1800-1950 nm), proteins and amino acids (2000-2300 nm). The decrease of the reflectance values observed between 700 nm and 1000 nm especially on spectra pretreated with SNV, MSC and EMSC methods (Figure IV.E.3B, E and F, respectively) is related to the apparition of senescing leaves that occurred during grain filling.

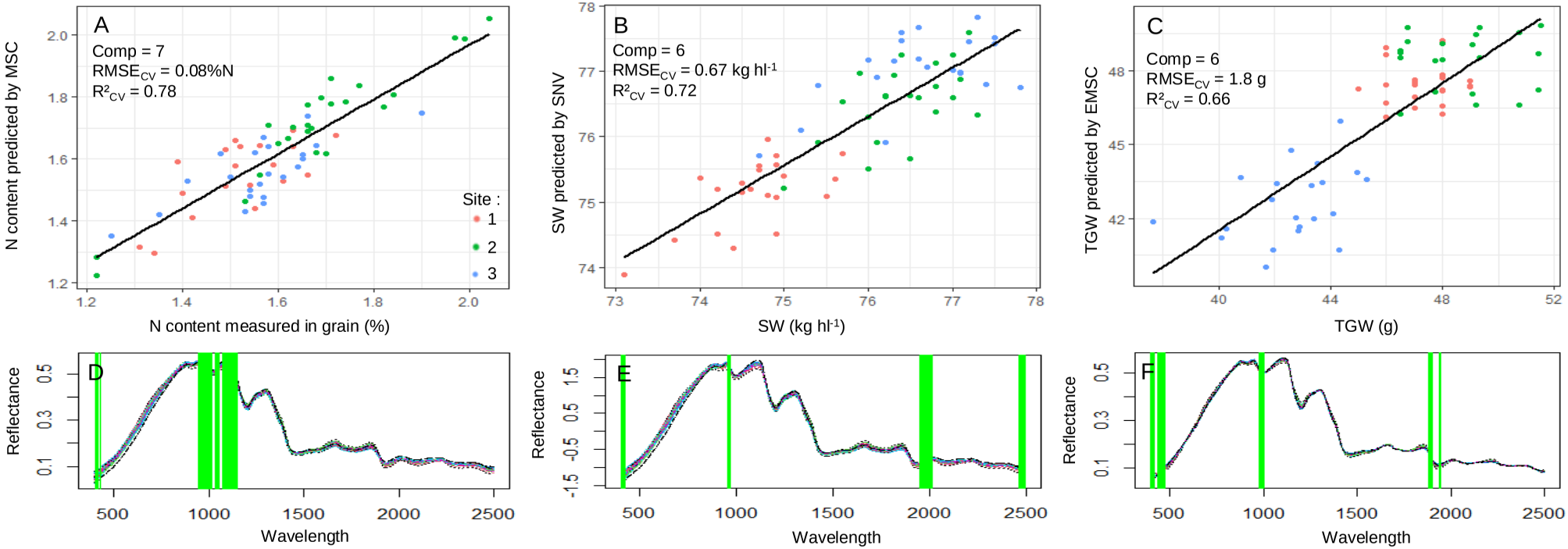
III.2 Creation and validation of PLSR models

III.2.a N content in flag leaves and grain yield prediction

Firstly, we correlated flag leaves spectra to N content in flag leaves and grain yield (Figure IV.E.4). For N content in flag leaves, a strong coefficient of determination was shown irrespective of the pre-treatment (R^2_{cv} > 0.75, Supplementary Table IV.E.2). The highest correlation between flag leaves spectra and N content in flag leaves was obtained with the PLSR model generated with spectra processed by SG2 (R^2_{cv} = 0.86 and $RMSE_{cv}$ = 0.29%N, Figure IV.E.4A). Five regions between 400 and 1000 nm were recruited from SG2 spectral database (Figure IV.E.4B) achieving nine components to build the model (Figure IV.E.4A). For grain yield prediction, the best result was obtained with the PLSR model generated with spectra processed by EMSC (R^2_{cv} = 0.41 and $RMSE_{cv}$ = 0.47 t ha^{-1}, Figure IV.E.4C). This model used three regions (700-850, 1400-1500 and 1800-1900 nm, Figure IV.E.4D) to build a prediction based on only one component indicating that the model was not relevant (Figure IV.E.4C). These results also highlighted that the three sites provided a wide range of data necessary to build relevant and robust models (Figure IV.E.4A and C).

III.2.b Prediction of N content in grain, SW and TGW by grain NIRS spectra

As described above, creation of PLSR models was applied to grain spectra for the correlation between grain spectra and grain quality parameters. Then, grain spectra were



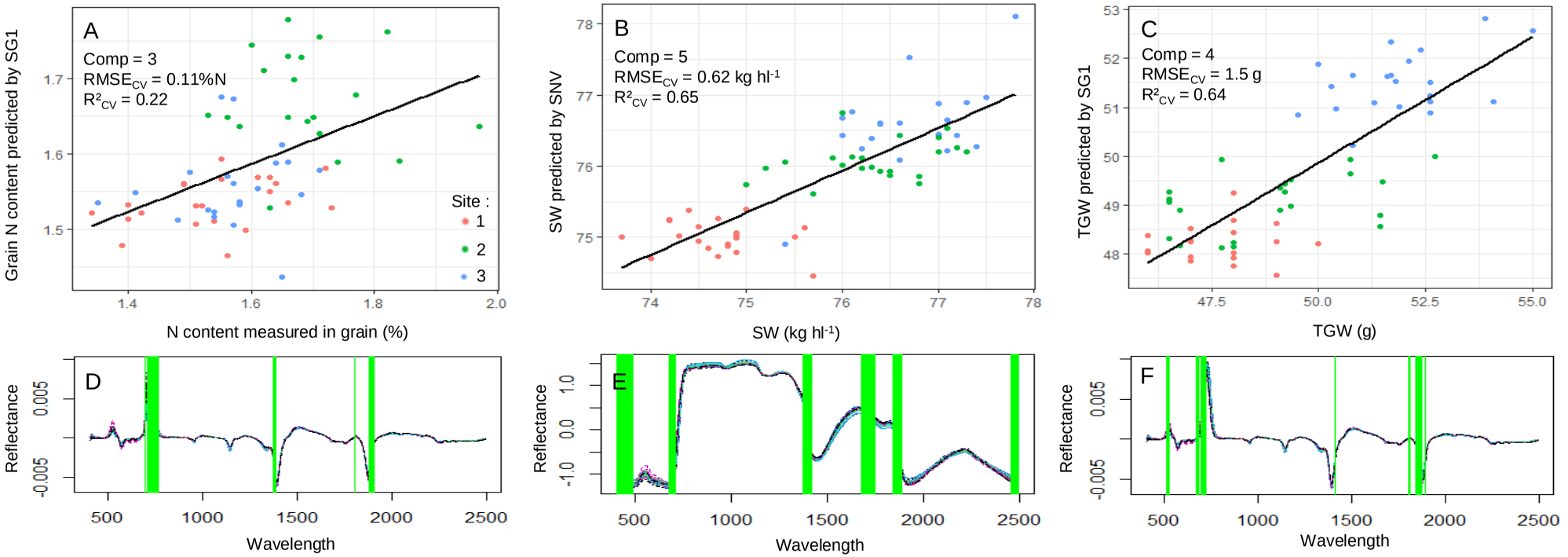
<u>Figure IV.E.5</u> : Relationship between prediction obtained by grain NIRS spectra at maturity processed by multiple scatter correction (MSC) and N content in grain (A), relationship between grain NIRS spectra at maturity processed by standard normal variate (SNV) and specific weight (SW), and relationship between grain NIRS spectra at maturity processed by extended multiple scatter correction (EMSC) and thousand grain weight (TGW) (C). Different wavelengths from MSC, SNV and EMSC spectral database, respectively, were involved in the model for N content (D), SW (E) and TGW (F) predictions. Plant culture was carried out under three different field conditions in Normandy (France): data from site 1 (red), site 2 (green) and site 3 (blue) are given in A, B and C (details about the experimental sites were given in Material and methods). N fertilization was provided at tillering, stem elongation and the flag leaf stages. Comp: number of components; $RMSE_{cv}$: root mean square error (cross validation); R^2_{cv}: coefficient of determination of the calibration (cross validation).

correlated with N content, SW and TGW (Figure IV.E.5). For all these parameters, we obtained correlations with R^2_{cv} > 0.5 irrespective of the pre-treatment (Supplementary Table IV.E.2). The highest correlation for N content in grain was obtained with PLSR model generated with spectra processed by MSC (R^2_{cv} = 0.78 and $RMSE_{cv}$ = 0.08%N, Figure IV.E.5A). For SW, the prediction with spectra processed by SNV showed the best result (R^2_{cv} = 0.72 and $RMSE_{cv}$ = 0.67 kg hl^{-1}, Figure IV.E.5B). In addition, spectra treated by EMSC was the optimal method to predict TGW (R^2_{cv} = 0.66 and $RMSE_{cv}$ = 1.8 g, Figure IV.E.5C). Different wavelengths from MSC, SNV and EMSC spectral database were involved in the model for N content, SW and TGW predictions, respectively (Figure IV.E.5D to F). Interestingly, the three predictions recruited wavelengths around 400 and 1000 (Figure IV.E.5D to F) while predictions of SW and TGW involved wavelengths around 1900 nm (Figure IV.E.5E and F). Moreover, only SW prediction implied wavelengths around 2400 nm (Figure IV.E.5E). As for the flag leaves, grain data from the three contrasting sites were very useful to build robust models independent of the cultivar (Figure IV.E.5A to C). Indeed, as indicated in Figure IV.E.5B and C, the site effect was strong regarding SW and TGW.

III.2.c Prediction of N content in grain, SW and TGW by flag leaf NIRS spectra at flowering

Furthermore, flag leaf spectra at flowering were correlated to N content in grain, SW and TGW (Figure IV.E.6). For N content correlation, three main regions (650-800, 1350-1400 and 1800-1900 nm) were recruited from SG1 spectral database (Figure IV.E.6D) achieving three components to build the model (Figure IV.E.6A). Irrespective of the pre-treatment, we did not show consistent correlation between flag leaf spectra and N content in grain (Supplementary Table IV.E.2). The best result was obtained using spectra processed by SG1 (R^2_{cv} = 0.22 and $RMSE_{cv}$ = 0.11%N, Figure IV.E.6A). This correlation was low mainly because of the data from site 2, which induced a lot of variability as N content predicted was very higher than N content measured in grain (Figure IV.E.6A).

However, predictions of SW and TGW by flag leaf spectra at flowering were robust irrespective of the pre-treatment (Supplementary Table IV.E.2). SW and TGW have both common regions heavily involved in the creation of the prediction model (400-550, 650-750, 1350-1450 and 1800-1900 nm, Figure IV.E.6E and F). Furthermore, the region 2450-2500 nm was recruited from SNV spectral database for SW prediction (Figure IV.E.6E) achieving five components to build the model (Figure IV.E.6B) while TGW prediction model use four



<u>Figure IV.E.6</u> : Relationship between prediction obtained by flag leaf NIRS spectra at flowering processed by Savitzky-Golay of order 1 (SG1) and N content in grain (A), relationship between prediction obtained by flag leaf NIRS spectra at flowering processed by standard normal variate (SNV) specific weight (SW) (B), and relationship between prediction obtained by flag leaf NIRS spectra at flowering processed by Savitzky-Golay of order 1 (SG1) and thousand grain weight (TGW) (C). Different wavelengths from SG1, SNV and SG1 spectral database, respectively, were involved in the model for N content (D), SW (E) and TGW (F) predictions. Plant culture was carried out under three different field conditions in Normandy (France): data from site 1 (red), site 2 (green) and site 3 (blue) are given in A, B and C (details about the experimental sites were given in Material and methods). N fertilization was provided at tillering, stem elongation and the flag leaf stages. Comp: number of components; $RMSE_{cv}$: root mean square error (cross validation); R^2_{cv}: coefficient of determination of the calibration (cross validation).

components (Figure IV.E.6C). Spectra processed by SNV was the best method to predict SW (R^2_{cv} = 0.65 and $RMSE_{cv}$ = 0.62 kg hl^{-1}, Figure IV.E.6B) and the use of SG1 pre-treatment resulted to the highest correlation between flag leaf spectra and TGW (R^2_{cv} = 0.64 and $RMSE_{cv}$ = 1.5 g, Figure IV.E.6C). As for prediction by grain NIRS spectra, SW and TGW predictions by flag leaf NIRS spectra at flowering were very dependents on the site conditions (Figure IV.E.6B and C).

IV. Discussion

Based on analysis of an extended spectral dataset covering the visible and NIR regions, we developed relevant calibrations for the characterization of important wheat traits related to the flag leaf (N content) or to the grains at the harvest (N content, TGW and SW). For all traits, the coefficient of determination (R^2_{cv}) and the values of the prediction error parameter ($RMSE_{cv}$) were relevant (expect for prediction of N content in grain and grain yield from flag leaf spectra), demonstrating that this approach constitutes a useful non-destructive method for observing these traits during the growth cycle and at maturity.

IV.1 Prediction of N content in flag leaves irrespective of the stage

Assess N content in fresh leaves could be a challenge because of the interference of water both inside the leaf and in the atmosphere (Ecarnot et al., 2013). With the use of leaf clip, water in the atmosphere was not a problem. In addition, the good spectral resolution (< 10 nm) and the pre-treatments were efficient to decorrelate leaf water from N content in leaves. In fact, with a SG2 pre-treatment, wavelength at 400, 800 and 1000 nm were highly correlated to N content in flag leaf (Figure IV.E.4B and Supplementary Figure IV.E.2) which correspond to leaf photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids, Croft and Chen, 2018).

Moreover, we used a large wide of samples corresponding to three different cultivars, contrasting plant growth environments and various growth stages for the calibration of N content in flag leaves. Therefore, the resulting calibration could be considered robust and precise for use at the specie scale. This is in agreement with the study of Ecarnot et al. (2013) that predicted N content in fresh leaves of durum wheat in the field throughout plant cycle with a portable spectrometer (R^2_{cv} > 0.9). A recent study also estimated leaf N content in spring and winter bread wheat based on fusion of spectral features and deep features from near infrared hyperspectral imagery (R^2_{cv} > 0.8, Yang et al., 2021). Our results showed the same strong relationship with a R^2_{cv} of 0.86 and a $RMSE_{cv}$ of 0.29%N (Figure IV.E.4A), which

suggested that this calibration may be used irrespective of the cultivar, the level of N nutrition and the pedoclimatic conditions.

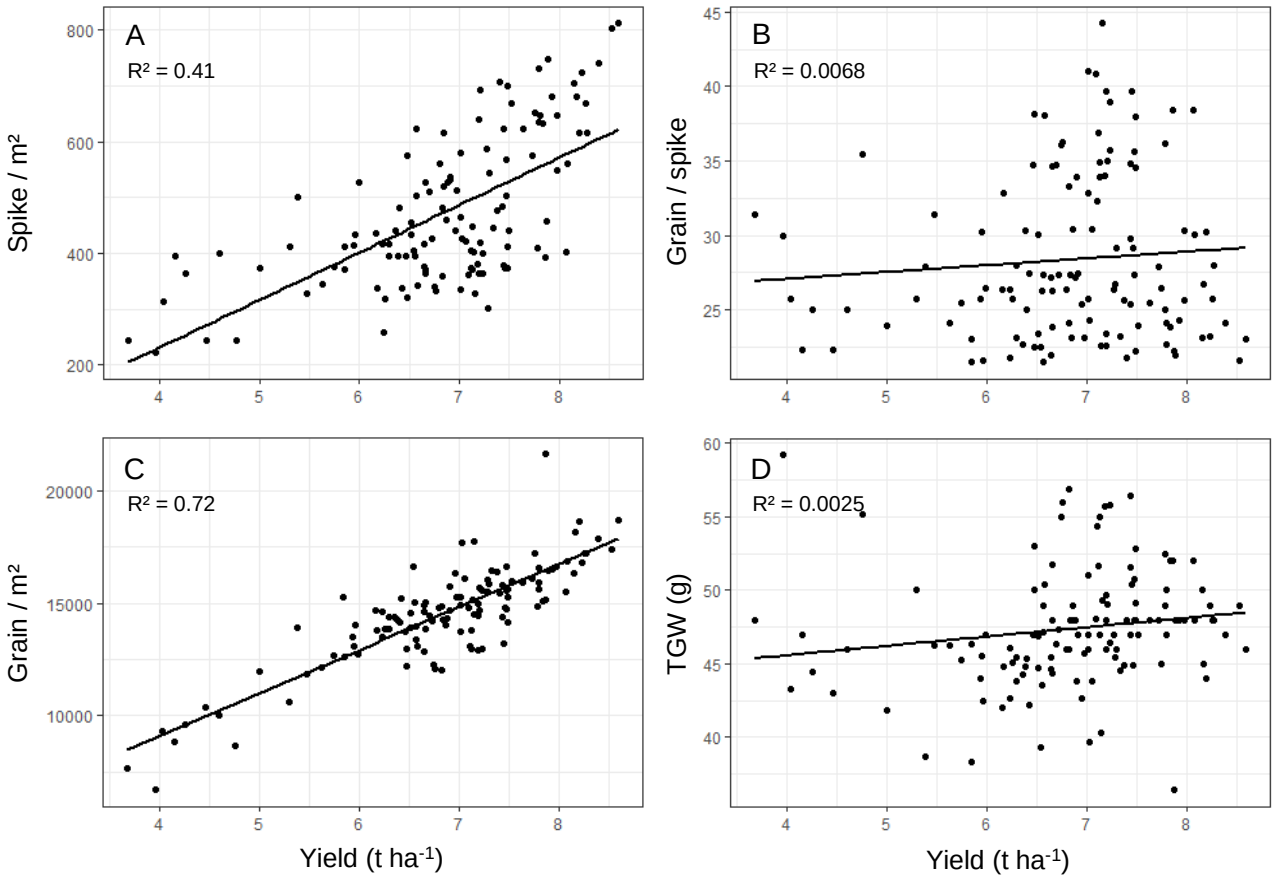
IV.2 Prediction of grain characteristics at maturity

In addition, predictions of grain quality traits by NIRS is well studied especially for wheat (Arazuri et al., 2012; Fontaine et al., 2002; García-Molina et al., 2016; Ye et al., 2018). In the present work, we correlated grain spectra with grain characteristics at maturity with robust coefficient of determination: R^2_{cv} = 0.78, R^2_{cv} = 0.72 and R^2_{cv} = 0.66 for N content in grain, SW and TGW, respectively. Predictions of N content in grain from flour spectra achieved a R^2_{cv} from 0.02 to 0.30 in durum wheat (Ferrio et al., 2004) while in bread wheat the coefficient of determination may be stronger (R^2_{cv} > 0.9, Owens et al., 2009). Thus, with intermediate values, our findings are consistent and could be a method to determinate N content in grain and estimate protein content without any sample preparation such as grinding. Indeed, it is well documented that NIRS is a good instrument to predict grain protein content in wheat (Başlar and Ertugay, 2011; Delwiche, 1998; Ye et al., 2018) and our study clearly confirmed this potential as we used the Dumas method and a coefficient of 5.7 is usually applied to obtain an estimate of protein content (Cohan et al., 2019).

NIRS is also used to assess SW and TGW as reported by Caporaso et al. (2018). SW and TGW could be determined from reflectance spectra obtained on flour of bread wheat (R^2_{cv} = 0.70 and 0.62, respectively) and also on whole wheat grain (R^2_{cv} = 0.70 and 0.69, respectively) (Owens et al., 2009). In durum, the correlation between TGW and flour NIRS spectra was lower than in our study (R^2_{cv} ≤ 0.25). However, the cross-validation of 160 wheat samples (representing 24 different cultivars and different N inputs) obtained the same result than the present study regarding the prediction of TGW (R^2_{cv} = 0.66, Garnsworthy et al., 2000). Moreover, wavelengths involved in the model are assigned mainly for chlorophyll and starch (Figure IV.E.5E and F, Croft and Chen, 2018), which are associated with grain filling (Masclaux-Daubresse et al., 2008; Rivera-Amado et al., 2020). Therefore, it was consistent to find these wavelengths for the prediction of SW and TGW.

IV.3 Predicting N content in grain and yield components using flag leaf spectra at flowering stage

Furthermore, predicting grain yield and quality during crop cycle is essential to adjust N fertilization for growing bread wheat with the dual objective of optimum grain yield and



<u>Supplementary Figure IV.E.3</u> : Correlation between grain yield and yield components : (A) spike number per square meter, (B) grain number per spike, (C) grain number per square meter and (D) thousand grain weight (TGW).

protein content (Tremblay et al., 2009; Zecha et al., 2018). In the present work, we correlated N content in grain with spectra taken on fresh flag leaves at flowering stage, but the robustness of the prediction was low (R^2_{cv} = 0.22, Figure IV.E.6A). This result was mainly due to data from site 2, which deviated from the prediction line (Figure IV.E.6A). As the measure on flag leaves was taken at flowering stage irrespective of the site, it might be a cultivar and/or an environmental effect because each site had a different wheat cultivar and agro-pedoclimatic characteristics (Figure IV.E.1). This deviation from the prediction line highlights that for predicting N content in grain, it may be interesting to have a specific calibration for each cultivar or each environment. Other optical tools such as chlorophyll meters used on flag leaves also help to estimate N content in grain but only when yields are below 8 t ha^{-1} (Aranguren et al., 2021), which was the case in our study (Figure IV.E.4C). However, RapidScan CS-45 (NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) and NDRE (Normalized Difference Red Edge)) and Yara N-Tester^{TM} are not able to predict N content in grain (Aranguren et al., 2020). Further developments will be necessary to determine the relevance and robustness of the relationship between reflectance spectra from flag leaves and the final N content in wheat grain.

On the other hand, our investigations highlighted the possibility to correlate NIRS spectra from flag leaves at flowering stage and grain yield components. Interestingly, we obtained relevant calibration for the prediction of SW and TGW from flag leaves spectra (R^2_{cv} > 0.6, Figure IV.E.6B and C). Indeed, SW and TGW are determined after flowering stage and depend on flag leaf status (Rivera-Amado et al., 2020) whereas other yield components are defined before flowering stage. For instance, spike number per square meter, grain number per spike and grain number per square meter are important yield components which are mainly elaborated before flowering stage. In the present work, spike number per square meter was correlated to grain yield (R^2 = 0.41, Supplementary Figure IV.E.3A) while grain number per spike was completely decorrelated (R^2 < 0.01, Supplementary Figure IV.E.3B). Therefore, grain number per square meter was the component that explained the most grain yield (R^2 = 0.72, Supplementary Figure IV.E.3C) whereas TGW could not be linked to yield (R^2 < 0.01, Supplementary Figure IV.E.3D). These findings explained the low robustness of the grain yield prediction. Indeed, the two yield components that were not yet fully defined at flowering stage were grain number per spike and TGW, which both not correlated with grain

yield. Even if the prediction of TGW was robust (Figure IV.E.6C), we could not predict grain number per square meter from flag leaves spectra (best R^2 = 0.16, data not shown). Thus, the prediction of grain yield from flag leaf spectra might be better in situations where TGW drives grain yield. However, Ferrio et al. (2004) also found significant relationships between grain yield and NIRS-predicted values from flour spectra in durum wheat grown under Mediterranean conditions with R^2_{cv} between 0.31 and 0.33 depending on the pedoclimatic conditions. In addition, Dualex® leaf clip is a fluorimeter tool that is also used on flag leaf to predict grain yield (Tremblay et al., 2009). Nevertheless, the prediction of grain yield from flag leaf remains difficult as yield depend on many components, which may compensate each other.

V. Conclusion

Using contrasting samples from three different sites in Normandy (France), NIRS calibrations were developed for the prediction of N content in flag leaves and in mature grain, and grain yield and its components in bread wheat. The different genotypes and pedoclimatic conditions involved in this study led to predictions that may be used in many situations except for the prediction of N content in grain from reflectance spectra measured on flag leaf at flowering stage which was dependent on the genotype and/or agro-pedo-climatic conditions. From flag leaves spectra, we could determine N content of this leaf irrespective of the stage (heading, flowering, and seed development). In addition, we confirmed that the use of NIRS on grain is relevant to predict grain N content, SW and TGW. Finally, the use of flag leaves spectra taken at flowering stage allowed the prediction of grain yield and N content in grain at maturity with a low robustness. However, these analysis of reflectance spectra made it possible to predict SW and TGW in a very robust way. These results will allow farmers and cooperatives to make better decisions regarding late N fertilization and wheat sales. Therefore, the use of NIRS could limit the leakage of fertilizer into the environment by adjusting the inputs and may avoid unnecessary expenses for the farmer. In addition, this tool could be also relevant for testing new N fertilization programs as well as for the screening of innovative N fertilizers and biostimulants that are able to optimize both grain yield and quality of bread wheat.

Author contributions

Conceptualization, R.C., V.M., P.D., P.R. and J-C.A.; methodology, R.C., V.M., P.D., P.R. and J-C.A.; software, R.C.; validation, R.C., V.M. and J-C.A.; formal analysis, R.C. and V.M.; investigation, R.C., V.M. and J.-C.A.; resources, V.M. and J.-C.A.; data curation, R.C. and V.M.; writing-original draft preparation, V.M., R.C. and J.-C.A.; writing-review and editing, V.M., P.D., P.R. and J.-C.A; visualization, R.C.; supervision, V.M. and J.-C.A.; project administration, V.M. and J-C.A.; funding acquisition, V.M. and J-C.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgments

This research and the APC were funded by ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie), which has supported this work as part of a PhD thesis (CIFRE 2017/1239), and by the Région Normandie and FEADER, which supported the FIELD-Prot project (EIP-AGRI). The authors deeply thank Régis Vecrin, Pierre-Vincent Protin and Frédéric Cardon for their involvement in this work and their valuable advice. The authors acknowledge Laetitia Mabire, Romain Laureau and Thomas Simon for helping with plant culture and harvesting. We are most grateful to the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for all the elemental analyses done by IRMS used in this study.

CHAPITRE V : Discussion générale

CHAPITRE V – DISCUSSION GÉNÉRALE

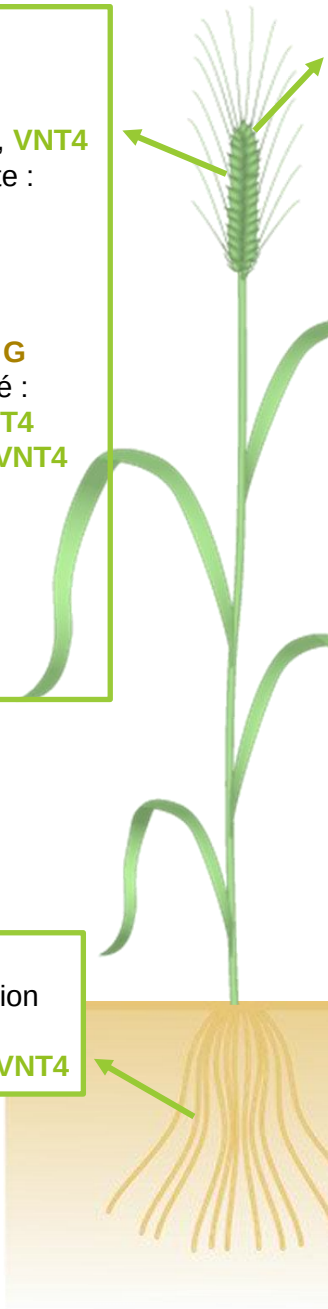
Les expérimentations conduites dans le cadre de cette thèse visaient à étudier les effets biostimulants de formulations à base de Glutacétine® chez le blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum* L.), une espèce très largement cultivée dans le monde pour son intérêt agroalimentaire majeur. Le choix de la Glutacétine® a été motivé par les précédentes études de l'entreprise Via Végétale montrant les effets bénéfiques de cette formulation chez diverses espèces végétales (colza, blé tendre de printemps, tomate, etc.) dans différentes conditions de culture (en hydroponie et au champ). Néanmoins, ces travaux se sont insuffisamment intéressés à la caractérisation des effets physiologiques et agronomiques tout au long du cycle et notamment pendant la phase reproductive. Par ailleurs, peu d'études sur les biostimulants ont été menées sur le blé tendre d'hiver en allant jusqu'à la récolte des graines, probablement du fait qu'il soit difficile de mettre en évidence des effets significatifs sur le rendement d'une culture déjà très productive. De plus, les connaissances antérieures sur les effets biostimulants de la Glutacétine® montrent que le couplage de cette formulation avec la fertilisation azotée sur le blé tendre est efficace (AMM n°1120000). Cependant, l'utilisation de la Glutacétine® se faisait jusqu'à présent uniquement en mélange avec la solution azotée et en application foliaire. Or, cette pratique est peu courante chez les agriculteurs par crainte de brûler les feuilles en appliquant de l'azote foliaire même si la Glutacétine® évite ces nécroses. **Dans ce contexte, l'objectif général de ces travaux de thèse a consisté à étudier l'effet de formulations à base de Glutacétine®, apportées soit en mélange avec l'engrais azoté en application au sol ou en foliaire, soit seule en application foliaire, sur :**

(i) la gestion de l'azote du blé, plus particulièrement durant la phase reproductive et les processus de sénescence associés à la remobilisation mais également sur les capacités d'absorption d'azote,

(ii) le rendement et ses composantes,

(iii) la qualité de la farine.

Ainsi, deux expérimentations sur l'ensemble du cycle de culture, l'une en conditions contrôlées et l'autre dans des conditions pédoclimatiques contrastées, ont été réalisées sur des plantes soumises à une fertilisation azotée maitrisée. Les travaux en conditions de plein



Grains :
- Rendement : VNT1, VNT3, VNT4
- Indice de récolte : VNT1, VNT4
- Indice de récolte en azote : G, VNT1, VNT4
- Azote total : VNT4
- Amélioration du PS : VNT1, VNT2, VNT4
- Augmentation du PMG : G
- Amélioration de la qualité :
  1. Phytates : VNT1, VNT4
  2. Biodisponibilité Fe : VNT4
  3. Mn : G
  4. Mo: VNT2
  5. B : G, VNT2
  6. Se : VNT2, VNT4
  7. Profil protéique : G, VNT1, VNT4

Fleurs :
- Fertilité : G, VNT1, VNT2, VNT3, VNT4
- Nombre de grains
  1. Par épi : G, VNT1, VNT2, VNT3, VNT4
  2. Par plante : G, VNT1, VNT2, VNT3, VNT4
  3. Par m² : G

Feuilles drapeaux :
- Maintien photosynthèse : G
- Teneur en S, Mo et Zn : VNT4

Parties aériennes :
- Biomasse
  1. Au cours du cycle : VNT4
  2. A maturité : VNT1, VNT2, VNT3, VNT4
- Efficience de remobilisation de l'azote : VNT1, VNT3, VNT4

Racines :
- Efficience de remobilisation de l'azote : G, VNT1, VNT2, VNT3, VNT4

Plante entière :
- EUA : VNT4
- Azote total : VNT4
- Absorption d'azote
  1. Au cours du cycle : VNT4
  2. En fin de cycle : G, VNT1, VNT4

Figure V.1 : Synthèse des effets positifs (significatif à 5 %) de la Glutacétine® (G) et des formulations à base de Glutacétine® (VNT1 à 4) sur les différents organes du blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum* L.) mise en évidence en conditions contrôlées (vert), au champ (marron) ou dans les deux expérimentations (rouge). PS : poids spécifique, PMG : poids de 1000 grains, EUA : Efficience d'Usage de l'Azote.

champ ont également permis de faire un bilan concernant l'impact agro-économique et agro-environnemental de ces biostimulants.

I. Les formulations à base de Glutacétine® optimisent l'EUA chez le blé

I.1 La Glutacétine®, VNT1 et VNT4 améliorent l'absorption d'azote

L'une des principales fonctions des biostimulants est l'amélioration de l'efficience d'usage des nutriments (du Jardin, 2015). L'expérimentation conduite en conditions contrôlées a montré que l'application VNT4 à la dose 3 (3 x 5 L ha^{-1}) a permis au blé d'absorber significativement plus d'azote durant l'ensemble du cycle de production (Figure V.1). Alors qu'aucun effet significatif n'a été mis en évidence avant le stade épiaison, l'absorption d'azote a été fortement augmentée durant la phase reproductive grâce à différentes formulations (Glutacétine®, VNT1-D2 et VNT4 aux trois doses, Figure V.1). Cet effet sur l'absorption d'azote a aussi été retrouvé en conditions de plein champ avec VNT4. En effet, le niveau d'azote total dans les parties aériennes du blé était significativement supérieur grâce à l'apport de 3 x 5 L ha^{-1} de VNT4 (+9,3% pour le N et +19,4% pour le ^{15}N, respectivement, Table IV.D.3). Cette meilleure absorption d'azote a été retrouvée tout au long du cycle, et plus particulièrement entre le stade tallage et le stade maturité (+7,3% pour le N et +16,9% pour le ^{15}N, Figure IV.D.3). De façon très intéressante, c'est aussi pendant la phase reproductive que l'absorption d'azote provenant de la solution azotée a été la plus élevée (+47,6%, Figure IV.D.3). Ces résultats montrent bien que la Glutacétine®, VNT1 et surtout VNT4 ont un effet bénéfique chez le blé en stimulant ses capacités d'absorption de l'azote principalement pendant la phase reproductive (Figure V.1). Cette meilleure absorption avait déjà été observée chez le blé après l'apport de bactéries (Nguyen et al., 2019), d'extraits d'algue et de champignon (Laurent et al., 2020) mais aussi d'inhibiteurs de la nitrification (Liu et al., 2013) et de l'uréase (Li et al., 2015). Néanmoins, à notre connaissance, il n'a jamais été démontré une aussi forte stimulation de l'absorption de l'azote pendant la phase reproductive chez le blé tendre.

I.2 Les formulations à base de Glutacétine® augmentent l'efficience de remobilisation de l'azote

L'amélioration de l'EUA peut aussi se faire grâce à une meilleure efficience de remobilisation de l'azote chez le blé (Hawkesford and Riche, 2020). L'étude en conditions contrôlées a permis de mettre en évidence de plus faibles teneurs en azote dans les pailles

et/ou les racines de blé à maturité après l'apport des formulations (Glutacétine®, VNT1, VNT3-D1, VNT4-D2 et VNT4-D3, Figure IV.A.2E et F). Ce constat suggérait une meilleure efficience de remobilisation de l'azote au profit des graines. C'était effectivement le cas pour toutes les formulations (sauf VNT4-D1) au niveau racinaire et pour VNT1-D1, VNT3-D1 et VNT4-D3 au niveau des pailles (Figure IV.A.3C et D). Cette remobilisation de l'azote plus efficiente s'explique par une accélération de la vitesse de sénescence induite par toutes les formulations (Figure IV.A.3B). Au champ, l'effet sur la teneur en azote dans les pailles n'a été retrouvé ni pour la Glutacétine® en foliaire (Table IV.C.1), ni pour VNT4 en application au sol (Table IV.D.2). Néanmoins, l'application de Glutacétine® seule en foliaire a provoqué des effets différents en fonction des conditions pédoclimatiques. Alors qu'elle n'a pas induit d'effet sur la teneur en azote résiduel des feuilles drapeaux sur le site 1, la Glutacétine® a initié plus précocement la sénescence sur le site 2 fertilisé avec de l'urée (p = 0,081) et l'a au contraire retardé sur le site 3 quel que soit la fertilisation (p < 0,01, Figure IV.C.3D). En application au sol, VNT4 a eu tendance à diminuer la teneur en azote des feuilles drapeaux pendant le développement des graines au champ (-7,8%, Figure IV.D.4A) même si ce n'était pas significatif au seuil de p < 0,05. De par leur mode d'action, les inhibiteurs de la nitrification et de l'uréase n'ont pas d'effet sur l'efficience de remobilisation de l'azote. En revanche, en agissant dans la plante, les biostimulants peuvent impacter ces processus ; c'est notamment le cas d'extraits d'algue et de champignon qui améliorent ce paramètre chez le blé dur (Laurent et al., 2020). Sur le blé tendre, nos travaux sur les formulations à base de Glutacétine® (Figure V.1) sont les premiers à mettre en évidence cet effet biostimulant sur la remobilisation de l'azote. Ainsi, toutes ces données convergent vers le fait que la Glutacétine® en foliaire et VNT4 appliqué au sol en mélange avec l'engrais azoté impactent l'efficience de remobilisation de l'azote, ce qui a nécessairement des répercussions sur la quantité totale d'azote dans les grains.

I.3 VNT4 et la Glutacétine® accroissent l'EUA et l'azote exporté par les grains

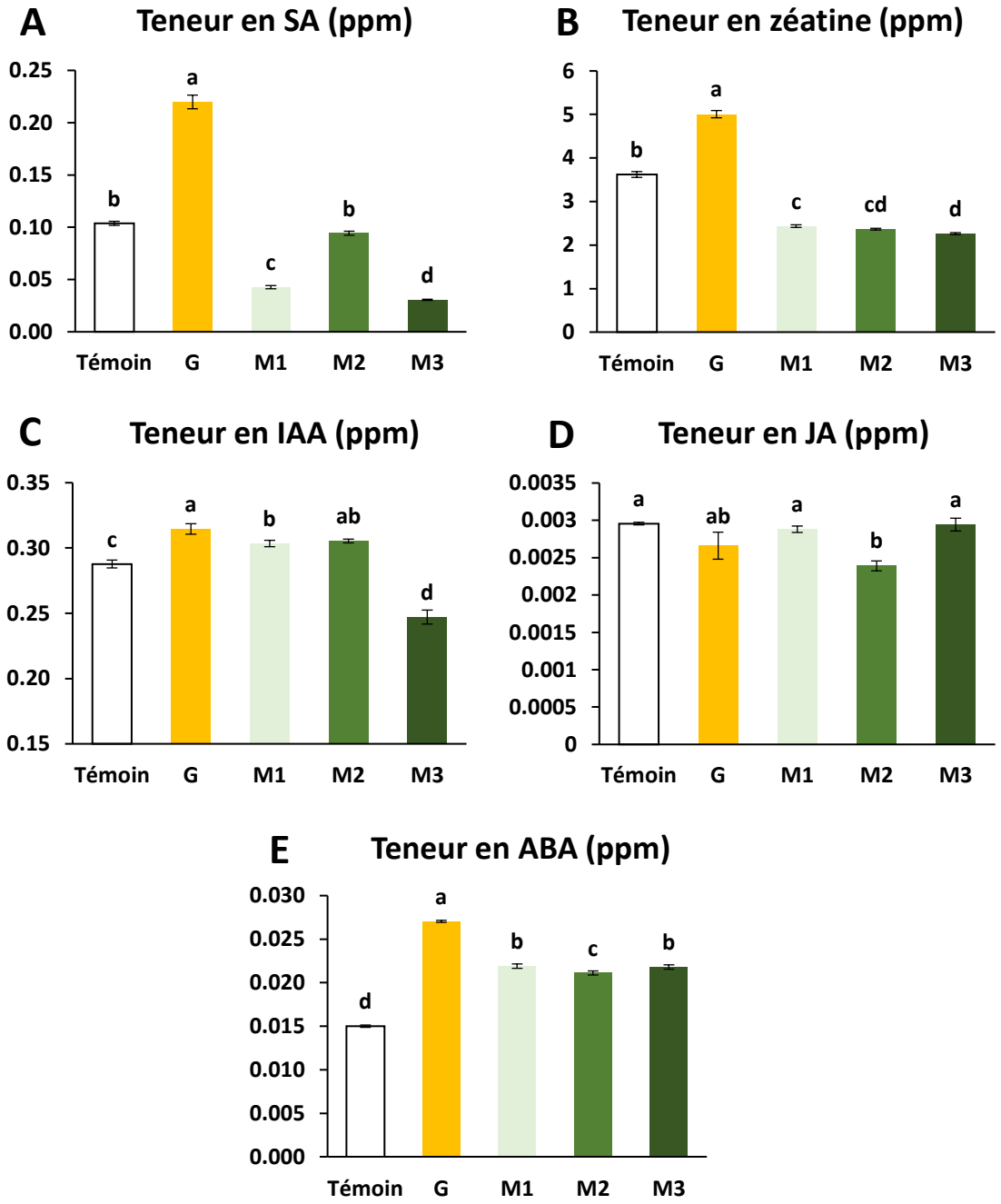
L'amélioration de l'EUA et de l'azote total exporté par les grains (indice de récolte en azote) sont deux objectifs majeurs visés par les inhibiteurs de l'uréase et de la nitrification (Abalos et al., 2014; Rekowski et al., 2020) mais aussi par les biostimulants (Laurent et al., 2020). En conditions contrôlées, l'EUA a été significativement augmentée uniquement par VNT4 à la dose 3 (3 x 5 L ha^{-1} ; Figure V.1). Ce résultat a été confirmé au champ quel que soit

les conditions pédoclimatiques et l'année même si l'effet était plus faible pour ce dernier paramètre (+3,8%, $p < 0,05$, Table IV.D.2). L'effet bénéfique de VNT4 sur l'EUA a été également observé en 2019 ($p = 0,075$, Table IV.D.2) alors que les conditions étaient idéales (météo et fertilisation azotée). En revanche, il n'y a pas eu de changement significatif en 2020 (météo moins favorable et fertilisation sous-optimale), ce qui suggère que cette formulation est plus efficace lorsque le blé est placé dans des conditions optimales. Concernant l'apport de Glutacétine® en foliaire, l'EUA a eu tendance à être améliorée en conditions contrôlées (+6,2%, non significatif, Table IV.A.2) et en conditions de plein champ (+3%, $p = 0,077$, Table IV.C.1). Tout comme d'autres biostimulants, l'application foliaire ou racinaire de formulations à base de Glutacétine® tend donc à améliorer l'EUA, permettant *in fine* d'augmenter la quantité d'azote dans les graines.

Effectivement, en serre, VNT4-D3 a permis d'accroître significativement l'azote total dans les grains (Figure V.1). De plus, cet effet a été retrouvé au champ puisqu'une augmentation moyenne de 9,8 kg N ha^{-1} a été observée sur les six sites étudiés (soit +6,1%, Figure V.1). La Glutacétine® apportée en foliaire tend également à faire augmenter l'azote total dans les grains ($p = 0,166$) quelles que soient les conditions pédoclimatiques, jusqu'à +9,6% sur le site 3 fertilisé avec de la solution azotée (soit +18,5 kg N ha^{-1}). Un apport de 3 x 5 L ha^{-1} de VNT4 (Dose 3) au sol ou de 5 L ha^{-1} de Glutacétine® en foliaire permet ainsi à l'agriculteur d'améliorer l'EUA et donc d'exporter plus d'azote dans les grains.

II. Les formulations à base de Glutacétine® déplafonnent les rendements du blé

L'azote est l'un des principaux facteurs limitant la productivité des grandes cultures (Hawkesford et al., 2013). L'amélioration de l'EUA par l'application d'inhibiteurs ou de biostimulants engendre donc généralement une amélioration de la productivité du blé (Abalos et al., 2014; Popko et al., 2018). En conditions contrôlées, plusieurs formulations en application au sol ont significativement augmenté le rendement en grains (Figure V.1) tandis que la pulvérisation de Glutacétine® a induit une amélioration de 13,7% (non significatif). Au champ, l'application de Glutacétine® seule en foliaire a aussi permis d'augmenter le rendement ($p = 0,076$, Table IV.C.1) de 345 kg ha^{-1} avec une fertilisation uréique et de 387 kg ha^{-1} avec de la solution azotée. Dans les deux expérimentations, l'amélioration du rendement était essentiellement due à un nombre significativement plus élevé de grains par épi (Figure



<u>Figure V.2</u> : Effet des formulations à base de Glutacétine® sur les teneurs en hormones dans les épis de blé tendre de printemps (*Triticum aestivum* L.) au stade floraison. (A) Teneur en acide salicylique (SA), (B) en cytokinine (zéatine), (C) en auxine (acide indole-3-acétique, IAA), (D) en acide jasmonique (JA) et (E) en acide abscissique (ABA). Les plantes ont été conduites en conditions contrôlées dans un mélange sable/perlite (1v:1v). L'azote a été apporté aux stades tallage (100 kg N ha^{-1}) et épiaison (50 kg N ha^{-1}) sous forme de solution azotée. La Glutacétine® (G) a été pulvérisée avec l'azote à raison de 5 L ha^{-1} lors du deuxième apport alors que les trois nouvelles formulations (M1, M2 et M3) ont été mélangées à la solution azotée et appliquées au sol aux deux apports. Les histogrammes indiquent les moyennes ± SE et les lettres dénotent les différences significatives selon le test de Fisher ($p < 0.05$, n = 3)

V.1). En serre, ce nombre de grains par épi a pu être lié à une meilleure fertilité des épis. En effet, le « fruiting efficiency » a été amélioré par l'application de toutes les formulations (Figure V.1). Cette optimisation de la fertilité des épis a conduit à un plus grand nombre de grains par plante en conditions semi-hydroponiques et par m^2 au champ (Figure V.1). La meilleure fécondation des épis pourrait provenir d'un impact des formulations à base de Glutacétine® sur la variation des teneurs en différentes hormones dans les épis au moment de la floraison. En effet, les phytohormones jouent un rôle important dans la fertilité des céréales (Kwon and Paek, 2016; Xiao et al., 2014; Zhang et al., 2006). Les données protéomiques des grains matures (Partie IV.B) ont montré que VNT1 accroit l'abondance d'une protéine impliquée dans la régulation de l'auxine (patellin-5). De plus, une étude réalisée en parallèle de cette thèse valide une partie de cette hypothèse. En effet, la Glutacétine® en application foliaire ainsi que trois formulations à base de Glutacétine® ont fait fortement évoluer les teneurs en acide salicylique (SA), en cytokinine (zéatine), en auxine (acide indole-3-acétique, IAA), en acide jasmonique (JA) et en acide abscissique (ABA) (Figure V.2). Alors que les teneurs en IAA et zéatine sont liées à l'élongation cellulaire et la teneur en ABA au remplissage du grain (Yang et al., 2019), ces données suggèrent donc que la Glutacétine® augmente les teneurs en hormones ayant un impact sur l'accumulation de réserves dans les grains. En serre, la dose 3 de VNT4 (3 x 5 L ha^{-1}) a conduit à la plus forte augmentation du rendement par rapport au témoin (+51,7%, Figure IV.A.1B), du fait d'un plus important nombre de grains par épi. En conditions de plein champ, l'application de VNT4 a eu davantage tendance à améliorer le nombre d'épis par mètre carré en favorisant le tallage (p = 0,05) alors qu'aucun effet significatif n'a été mis en évidence sur le nombre de grains par épi. Cela peut s'expliquer (i) par le fait qu'en conditions contrôlées, les tubes ne laissaient pas suffisamment de place pour un tallage important (trois talles par plante en moyenne, Table IV.A.2), l'effet biostimulant sur ce paramètre a donc pu être masqué, et (ii) par le fait que la première application en serre et au champ n'a pas été effectuée exactement au même stade (fin tallage en serre, début tallage au champ), laissant plus de temps au biostimulant au champ pour agir sur le tallage. Pour autant, le résultat sur le nombre total de grains est identique à l'application foliaire avec un nombre de grains par plante et par m^2 supérieur au témoin en serre et au champ, respectivement (Tables IV.A.2 et IV.D.2).

Table V.1 : Calcul du chiffre d'affaires généré par un hectare de blé tendre avec ou sans le biostimulant (hors coût du biostimulant)

	Synthèse 2019 (moyenne urée et solution azotée, n = 6)			Synthèse 2019-2020 (moyenne solution azotée, n = 6)		
	Témoin	**Glutacétine®**	**Différence**	**Témoin**	**VNT4**	**Différence**
Rendement (t ha^{-1})	11,452	11,818	*+ 0,366*	9,037	9,396	*+ 0,359*
Revenu si prix du blé à 150 € t^{-1} (€ ha^{-1})	1718	1773	*+ 55*	1356	1409	*+ 53*
Revenu si prix du blé à 200 € t^{-1} (€ ha^{-1})	2290	2364	*+ 74*	1807	1879	*+ 72*
Revenu si prix du blé à 250 € t^{-1} (€ ha^{-1})	2863	2955	*+ 92*	2259	2349	*+ 90*

Les composantes du rendement sont donc fortement impactées par les formulations à base de Glutacétine®. Or ces composantes sont également dépendantes de balances hormonales. L'ensemble de nos travaux suggèrent donc d'explorer davantage les fluctuations des teneurs en hormones susceptibles d'être induites par les biostimulants à base Glutacétine® et de rechercher le lien potentiel avec l'amélioration de la fertilité du blé tendre.

III. Les formulations à base de Glutacétine® modifient la qualité de la farine de blé

L'un des principaux intérêts à l'usage des biostimulants est aussi l'amélioration de la qualité du produit récolté (Rouphael and Colla, 2020). Dans le cadre de ces travaux, les critères qualitatifs étudiés sont le profil nutritionnel (ionome et phytates) et le profil protéique (protéome) de la farine de blé. Au niveau de la teneur en éléments, il a été constaté une baisse de la teneur en P lié à la teneur en phytates (Figure V.1). Il s'agit d'un point positif puisque les phytates sont des facteurs antinutritionnels qui limitent la disponibilité des certains micronutriments (Ficco et al., 2009). En conditions contrôlées, les fortes augmentations de rendements ont aussi conduit à des baisses des teneurs en S, Mg, Ca, Na, Fe, Mn et Cu variables selon les formulations et les doses (Table IV.A.3). A l'inverse, les teneurs en Mo, B, Cd et Se ont été augmentées par certaines formulations (Figure V.1). Au champ, la baisse de la teneur en P, Mg et Fe a été confirmée dans certaines situations alors que la teneur en Mn a augmenté suite à la pulvérisation de Glutacétine® (Figure V.1). Ces effets sont en accord avec plusieurs études montrant que l'application de biostimulants changent les teneurs en minéraux dans le grain de blé (Popko et al., 2018; Wang et al., 2020; Yadav et al., 2020).

Par ailleurs, les changements au niveau du ionome, notamment la réduction de la teneur en S, ont permis d'émettre l'hypothèse de possibles modifications au niveau du profil protéique de la farine de blé en réponse aux biostimulants. De tels effets ont d'ailleurs été mis en évidence dans une récente étude concernant l'impact d'extraits d'algue et champignon sur le protéome des grains du blé dur (Pichereaux et al., 2019). L'analyse du protéome des grains issus de l'expérimentation en conditions contrôlées a permis d'identifier de nombreux changements du niveau d'abondance de protéines suite à l'application de la Glutacétine®, de VNT1 et de VNT4 (Partie IV.B). Les formulations à base de Glutacétine® ont principalement impacté des protéines impliquées dans la régulation de la synthèse des protéines, la réponse aux stress, les fonctions de stockage et les processus liés à la germination. Ces résultats

Table V.2 : Quantité d'azote et de ^{15}N disponibles et apportés sur le site 4 et distribution de l'azote au moment de la récolte à maturité en fonction de l'apport ou non de l'additif VNT4.

Besoin total de la culture (kg N ha^{-1})	305			
Azote total dans le sol à la sortie de l'hiver (kg N ha^{-1})	3 314			
Azote du sol disponible pour la culture (kg N ha^{-1})	90			
Fertilisation azotée (kg N ha^{-1})	175			
Quantité de ^{15}N apportée (kg N ha^{-1})	4,375			
Modalité	**Témoin**	**VNT4**	**Delta (unitaire)**	**Delta (%)**
Azote total dans les parties aériennes (kg N ha^{-1})	143	156	+ 13	*+ 9.1%*
Azote total dans le sol à la récolte (0-60 cm, kg N ha^{-1})	3 079	3 121	+ 42	*+ 1,4%*
Azote volatilisé ou lessivé (kg N ha^{-1})	357	302	- 55	- 15,4%
^{15}N total dans les parties aériennes (kg N ha^{-1})	1,262	1,507	+ 0,245	*+ 19,4%*
^{15}N dans le sol à la récolte (kg N ha^{-1})	0,490	0,266	- 0,224	- 45,7%
^{15}N volatilisé ou lessivé (kg N ha^{-1})	2,623	2.602	- 0,021	- 0.8%

Poids de sol pris en compte : 0,6 m (profondeur) x 10 000 m^2 x 1,2 (densité) x 0.5 (porosité) = 3 600 tonnes de sol par hectare

novateurs démontrent le potentiel des formulations à base de Glutacétine® sur l'amélioration de certains traits liés à la qualité nutritionnelle de la farine de blé tendre. Même si ces observations devront être confirmées notamment chez d'autres variétés de blé tendre, les variations de la qualité des protéines de réserve engendrées par ces biostimulants devront également être étudiées sur la qualité technologique de la farine (qualité boulangère, comportement en biscuiterie, etc.).

IV. La Glutacétine® et son dérivé VNT4 sont profitables sur le plan agro-économique et agro-environnemental

IV.1 Bilan économique lié à l'utilisation de la Glutacétine® et de VNT4

Au-delà des bénéfices sur le rendement, l'EUA et la qualité grainière, l'utilisation de formulations biostimulantes par les agriculteurs pourra se généraliser si des revenus supplémentaires sont générés. Dans ce contexte, un calcul du chiffre d'affaires produit par une culture de blé avec et sans les biostimulants testés au champ a été réalisé (Table V.1). En moyenne, la pulvérisation de Glutacétine® au stade dernière feuille étalée permet un gain de 366 kg de grains par hectare tandis que l'ajout de VNT4 à chaque passage de solution azotée induit une amélioration du rendement de 359 kg ha^{-1}. Basé sur ces chiffres, trois scénarii ont été imaginés en fonction du prix du blé : un prix bas (150 € t^{-1}), un prix moyen (200 € t^{-1}) et un prix élevé (250 € t^{-1}). Ces différents scénarii indiquent que l'application de formulations à base de Glutacétine® génère un chiffre d'affaires complémentaire de 53 à 92 € ha^{-1}. L'application en mélange à la solution azotée présente l'avantage de ne pas engendrer un passage de tracteur supplémentaire dans la parcelle. En revanche, pulvériser de la Glutacétine® seule en foliaire peut nécessiter une sortie complémentaire et donc des coûts associés (main d'œuvre, carburant, etc.). Il est donc essentiel d'envisager l'application de Glutacétine® en mélange avec un produit appliqué au même stade tel qu'un fongicide.

VI.2 VNT4 limite les effets négatifs de l'azote sur l'environnement

Par ailleurs, le principal problème de la fertilisation azotée est la pollution qu'elle peut engendrer lorsque l'azote n'est pas bien assimilé par la culture : c'est pour cette raison que l'optimisation de l'EUA est une stratégie essentielle (Tedone et al., 2018). L'étude de la distribution de l'azote après la récolte du blé sur le site 4 (ayant reçu de l'azote marqué au ^{15}N) rend compte de l'effet de VNT4 (Table V.2). Globalement, alors que l'azote du sol représente plus de 90% de l'azote du système (Figure V.3), l'application de VNT4 a conduit à

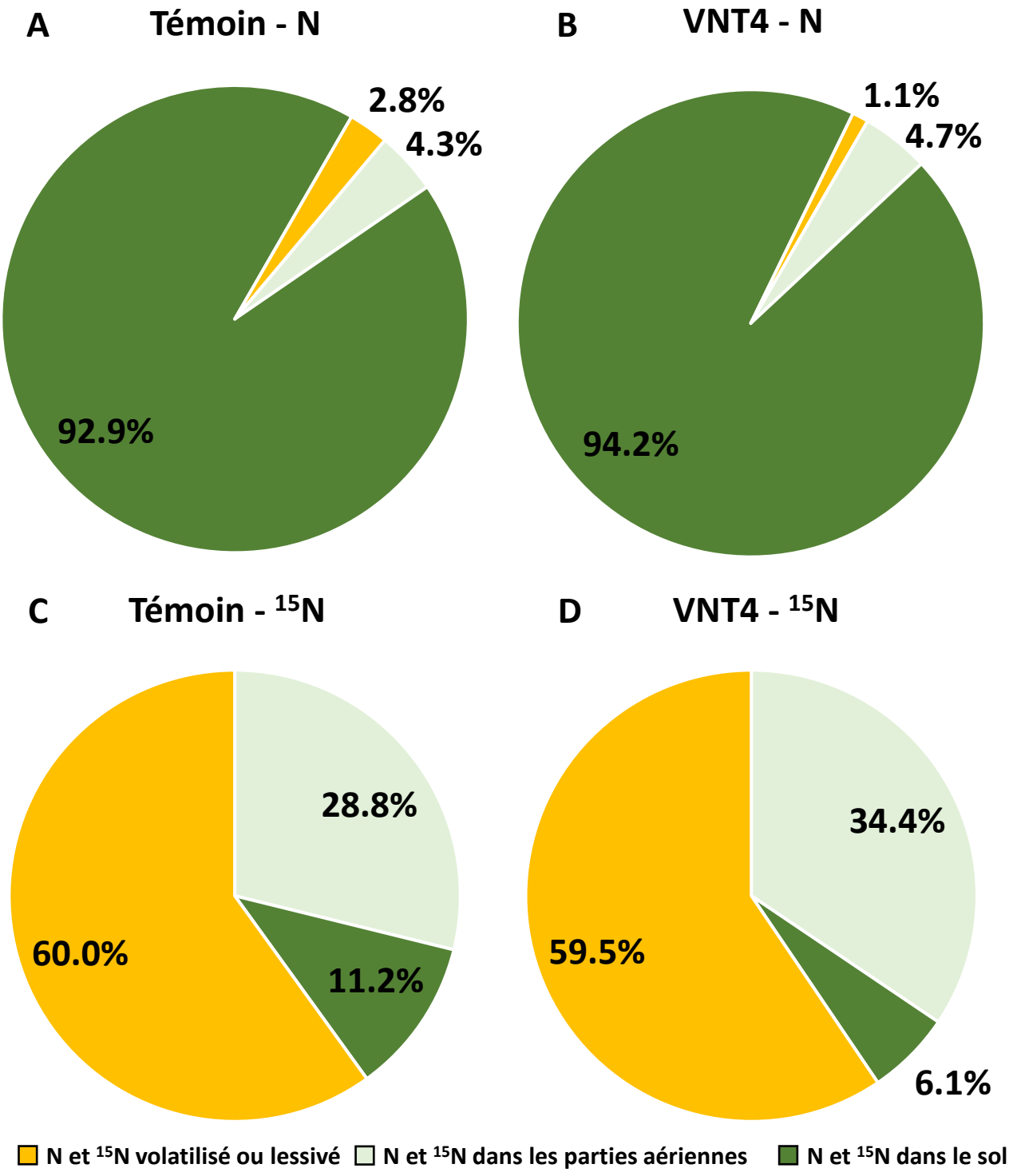
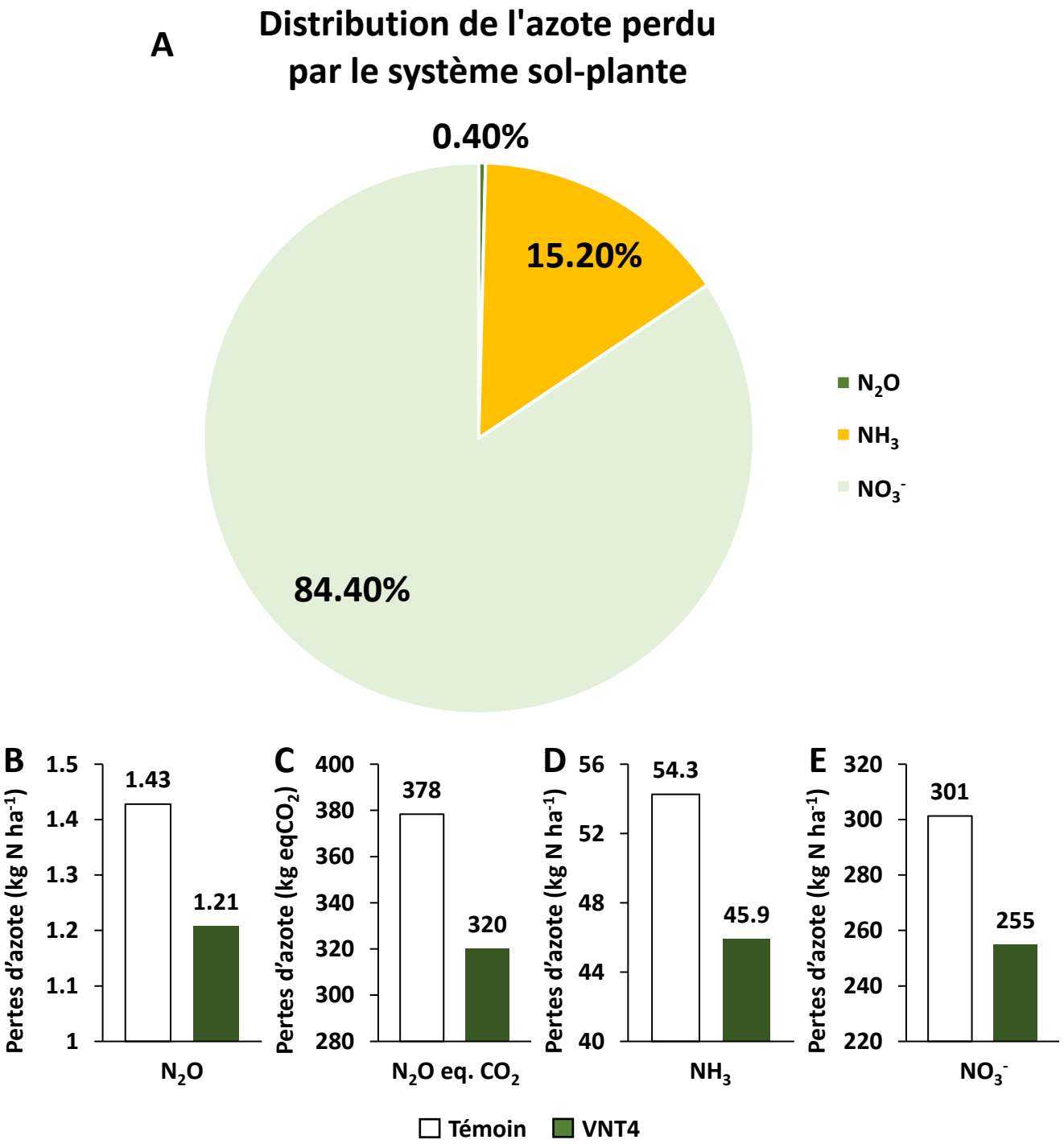


Figure V.3 : Distribution de l'azote et du ^{15}N sur le site 4 au moment de la récolte à maturité. Répartition de l'azote (A) des parcelles n'ayant pas reçu d'additif, (B) ayant reçu VNT4 et répartition du ^{15}N (C) des parcelles n'ayant pas reçu d'additif et (D) ayant reçu VNT4.

une légère augmentation des reliquats azotés (+1,4%, soit 42 kg N ha^{-1}) dans les 60 premiers centimètres (Table V.2). Au niveau du couvert végétal (représentant environ 4-5% de l'azote du système, Figure V.3), VNT4 a augmenté la quantité d'azote présente dans les parties aériennes du blé de 9,1% (+13 kg N ha^{-1}) par rapport au témoin (Table V.2). L'ensemble de ces données indiquent que VNT4 diminue de 15,4% les pertes d'azote par volatilisation ou lixiviation : mélanger VNT4 à la solution azotée évite ainsi la fuite de 55 unités d'azote par hectare sur l'ensemble du cycle (Table V.2).

En s'intéressant plus particulièrement à l'azote provenant de la solution azotée (^{15}N), il a été constaté une amélioration de 19,4% de l'absorption de cet azote dans les parties aériennes du blé grâce à VNT4 (Table V.2), correspondant à 9,8 unités d'azote. La proportion d'azote retrouvé dans les parties aériennes de la plante passe donc de 28,8% à 34,4% avec l'application de VNT4 (Figure V.3). Ces données sont en accord avec la littérature qui indique que le blé absorbe environ un tiers de l'azote minéral qu'on lui apporte, cet azote se situant majoritairement dans le grain (Hawkesford and Riche, 2020). Néanmoins, dans un contexte d'agriculture intensive comme en France, l'EUA est souvent supérieure à 70% (Cohan et al., 2019). De plus, l'azote marqué était beaucoup moins présent dans le sol des parcelles ayant reçu l'additif VNT4 (-45,7% par rapport au témoin, soit 9 unités) : 11,2% de l'azote apporté reste dans le sol pour le témoin alors qu'il s'agit seulement de 6,1% quand VNT4 est appliqué (Figure V.3). En revanche, les pertes d'azote issu de la solution azotée sont sensiblement identiques avec ou sans l'additif alors qu'elles sont très importantes (environ 60%, Figure V.3). Ces données signifient que VNT4 accroit l'absorption d'azote provenant de l'engrais et donc diminue sa présence dans le sol, mais ne limite pas ces pertes.

Contrairement aux inhibiteurs d'uréase et de la nitrification (Abalos et al., 2014), la réduction des pertes par volatilisation ou lessivage est donc un effet indirect de VNT4. La plus forte absorption de l'azote provenant de l'engrais induite par VNT4 permet de consommer moins d'azote provenant du sol. Comme le blé absorbe plus efficacement l'azote de l'engrais avec VNT4, les plantes et les microorganismes n'ont probablement pas eu à rendre disponible l'azote organique du sol (Ingraffia et al., 2020; Pramanik et al., 2017). Cet azote est alors probablement resté sous des formes peu sensibles à la volatilisation et au lessivage ; il est donc encore présent dans le sol à la fin du cycle de production. Avec VNT4, le blé utilise donc préférentiellement l'azote provenant de l'engrais.



<u>Figure V.4</u> : Distribution de l'azote perdu par forme et effet de VNT4 sur chaque forme sur le site 4. (A) Distribution de l'azote par le système sol-plante (moyenne de 22 situations climatiques à partir de 2000 couvrant l'ensemble du littoral de la Manche) estimé grâce au modèle Syst'N®, et pertes d'azote sur le site 4 en 2020, sur les parcelles ayant reçu ou non VNT4, sous forme de N_2O (B), N_2O équivalent CO_2 (C), NH_3 (D) et NO_3^- (E).

Enfin, grâce au modèle Syst'N®, un outil de diagnostic des pertes d'azote dans les systèmes de culture réalisé dans le cadre du RMT Fertilisation & Environnement, il a été possible d'estimer la proportion d'azote perdu sous forme de N_2O, de NH_3 et de NO_3^-. Après avoir rentré l'itinéraire technique du blé, les caractéristiques du sol du site 4 ainsi que 22 situations climatiques à partir de 2000 qui couvrent l'ensemble du littoral de la Manche (depuis la Bretagne jusqu'à la Picardie), la modélisation a permis d'estimer que les pertes d'azote se distribue de la façon suivante : 0,40%, 15,2% et 84,4% sous forme de N_2O, de NH_3 et de NO_3^-, respectivement (Figure V.4.A). VNT4 réduirait ainsi les pertes de 0,22 kg N ha^{-1} sous forme de N_2O (soit 58 kg équivalent CO_2, avec un pouvoir de réchauffement global de 265 eqCO_2 comme préconisé par le GIEC, Stocker et al., 2013), de 8,4 kg N ha^{-1} sous forme de NH_3 et de 46 kg N ha^{-1} sous forme de NO_3^- (Figure V.4.B à E).

V. Multiplex®, SPAD, XRF et NIRS : des outils utiles pour évaluer les pratiques agronomiques

Dans le cadre de ces travaux de thèse, plusieurs outils de diagnostic ont été utilisés afin d'évaluer l'effet de l'application des biostimulants sur différents aspects physiologiques et de qualité du produit récolté. Le premier outil employé a été le fluorimètre portable Multiplex® (Force-A). Cet appareil a permis de suivre en dynamique l'évolution de la culture mis en place en conditions contrôlées. Les indices de chlorophylles, d'anthocyanes, de flavonoïdes et de nutrition azotée ont été mesurés du stade tallage jusqu'au remplissage du grain. Dans cette étude, les formulations ont impacté ces indices essentiellement durant la sénescence. Le Multiplex® a ainsi été utile pour mettre en évidence l'effet des formulations sur la vitesse de sénescence du blé tendre en conditions contrôlées (Table V.3). Néanmoins, au champ, même si des mesures ont été prises durant les deux années d'expérimentation, très peu d'effets biostimulants ont été constatés et les indices n'ont pas encore été corrélés aux données biochimiques. Alors qu'en serre les mesures ont été prises de façon horizontale avec un écran noir derrière les plantes (limitant les interférences), les données prises au champ l'ont été de façon verticale au-dessus du couvert végétal. Dans ces conditions, des interférences liées au stade de développement de la culture (notamment avec l'apparition des épis) ont été constatées. Compte tenu de l'intérêt de ce fluorimètre pour évaluer le statut nutritionnel du blé (Zecha et al., 2018, 2017), sa calibration avec des données issues du champ devra être étudiée plus finement.

Table V.3 : Synthèse de l'utilisation et de la calibration des outils de diagnostic

Outil	En serre	Au champ
Multiplex® (Force-A)	Utilisation pour le suivi de la vitesse de sénescence (Figure IV.A.3B).	Utilisation au champ et calibration avec les données biochimiques en cours.
SPAD (Konica Minolta Sensing)	Utilisation dans le cadre de l'étude mettant en évidence l'effet des formulations à base de Glutacétine® sur les teneurs en hormones dans les épis.	Utilisation et calibration sur les feuilles drapeaux au champ (Figure IV.C.3).
S1 Titan (Bruker)	Utilisation sur les feuilles drapeaux (fraiches) afin d'évaluer le potentiel de l'outil. Utilisation et calibration avec l'ICP-MS-HR sur la farine et la paille (poudre) (Supplementary Figures IV.C.2 et 3)	Utilisation de la calibration pour déterminer les ionomes de la farine (P, K, S, Mg, Ca, Fe, Zn et Mn) et des pailles (K, Mg, S, Ca et Fe) (Tables IV.C.3 et 4)
LabSpec® (ASD Inc.)	Utilisation sur les feuilles drapeaux (fraiches), les graines et la farine afin d'évaluer le potentiel de l'outil.	Calibration sur les feuilles drapeaux et les graines (teneurs en azote) et estimation de la teneur en azote et des composantes du rendement à partir des données des feuilles drapeaux à floraison (Partie E)

Par ailleurs, la pince SPAD (ou N-Tester®) est un autre outil très largement utilisé pour déterminer la teneur en azote des feuilles du blé tendre d'hiver (Ravier et al., 2017). Pour l'expérimentation au champ, cette pince a été utilisée afin d'évaluer l'effet des biostimulants sur la teneur en azote des feuilles drapeaux pendant la phase reproductive (Table V.3). Une calibration robuste a pu être déterminée grâce à la variabilité des teneurs en azote dans les échantillons récoltés (Figure IV.C.3A). Même si aucune différence significative a été constatée à un stade donné, cet outil a ainsi permis de démontrer l'effet de la Glutacétine® sur le maintien de la photosynthèse pendant le développement des grains sur le site 3 (Figure IV.C.3D). Plus globalement, la pince SPAD a montré les fortes différences de comportements entre les sites telles que des teneurs en azote très contrastées au stade épiaison (Figure IV.C.3B) et un début plus précoce de la sénescence sur le site 2 (Figure IV.C.3D).

Quelques études mettent aussi en avant l'intérêt de la fluorescence à rayon X pour déterminer la teneur en éléments des organes du blé (Griffiths et al., 1990; Machado et al., 2018; McLaren et al., 2012) . L'utilisation du système XRF portable (S1 Titan, Bruker) durant l'expérimentation en conditions contrôlées a montré un intérêt pour détecter les éléments présents dans les feuilles drapeaux, la farine et la paille. Les données sur la farine et la paille ont ensuite été corrélées avec des valeurs provenant d'analyses ICP-MS-HR (Table V.3). Les teneurs en P, K, S, Mg, Ca, Fe, Zn et Mn de la farine et celles en K, P, Mg, S, Ca, Fe et Ni de poudres de paille peuvent maintenant être analysées en 64 secondes grâce au XRF (Article C). Ces équations de calibration ont été utilisées pour déterminer les ionomes de la farine et de la paille des échantillons provenant du champ (Tables IV.C.3 et 4). Par ailleurs, le travail sur les feuilles drapeaux devra être approfondi pour permettre l'analyse rapide des profils minéraux de cette feuille et pouvoir les corréler au statut nutritionnel de la plante entière ou de la culture.

Enfin, la spectrométrie proche infra-rouge se développe de plus en plus pour déterminer différents paramètres physiologiques et biochimiques notamment chez le blé (Ecarnot et al., 2013; García-Molina et al., 2016). Les plantes en serre ont donc fait l'objet de mesures afin d'évaluer le potentiel de cette technologie sur les feuilles, les graines et la farine. Comme ces premiers spectres semblaient intéressants, une étude plus approfondie sur les feuilles drapeaux (fraiches) et les graines a été réalisée en s'appuyant sur les dispositifs expérimentaux au champ. Ce travail réalisé en collaboration avec Philippe D'Hooghe

(SILEBAN) et Pierre Roumet (unité AGAP INRAE de Montpellier) a abouti à des équations de prédiction de la teneur en azote des feuilles drapeaux et des graines grâce à des mesures des spectres de réflectance sur ces organes (Figure IV.E.4 et 5). De plus, les mesures sur les feuilles drapeaux au stade floraison ont conduit à une prédiction possible du rendement grainier, du PS, du PMG et de la teneur en azote du grain (Table V.3). Ce travail très prometteur devra être poursuivi pour que cet appareil puisse devenir un véritable outil d'aide à la décision pour optimiser les stratégies de fertilisation et donc l'EUA.

CHAPITRE VI : Principales perspectives

CHAPITRE VI – PRINCIPALES PERSPECTIVES

I. Améliorer les dispositifs expérimentaux pour mieux évaluer les effets biostimulants

Dans les expérimentations en conditions de plein champ, il a été remarqué un effet positif de l'application de VNT4 sur le nombre d'épis par m^2. Or, cet effet n'avait pas été mis en évidence en conditions contrôlées du fait de l'application tardive du biostimulant (fin tallage) et de la forte densité (250 plantes m^{-2}). Cette densité est effectivement importante puisqu'il s'agit plus généralement d'une densité de semis au champ avec pour objectif la levée d'environ 200 plantes par m^2. Par ailleurs, le repiquage de deux plantules dans chaque tube de 8 cm de diamètre implique une forte compétition au niveau de l'occupation de l'espace pour le tallage. Lors des futures expérimentations en serre, il serait donc pertinent d'appliquer VNT4 au début du tallage à raison d'une plante par tube, ce qui permettrait d'avoir une faible densité (125 plantes m^{-2}) propice au tallage et donc à la mise en évidence d'un effet biostimulant sur ce paramètre.

De plus, les dispositifs expérimentaux mis en place durant ces travaux de thèse visaient à évaluer l'impact des biostimulants sur le blé ayant reçu un seul type de fertilisant. Or, les agriculteurs appliquent rarement une seule forme d'azote au cours du cycle du blé. Il s'agit plus souvent d'un mix de type solution azotée ou urée lors des deux premiers apports puis ammonitrate au dernier apport. L'apport d'engrais azotés incluant du soufre sur le blé tendre se généralise aussi peu à peu dans l'objectif de favoriser l'équilibre N-S. Evaluer l'effet des formulations à base de Glutacétine® sur des programmes de fertilisation pratiqués par les agriculteurs semblent donc important afin d'être au plus proche de la réalité.

Enfin, le traçage isotopique de l'azote (^{15}N) a permis de suivre précisément les flux d'azote provenant de l'engrais ou déjà présent dans le sol. Cette technique a montré l'effet de l'apport de VNT4 sur la limitation des pertes d'azote provenant du sol. Pour autant, la quantification de chaque forme d'azote perdu n'a pas pu être déterminée avec ce système. Afin d'estimer précisément les gains environnementaux obtenus grâce aux formulations à base de Glutacétine® (limitation des émissions de N_2O et NH_3, et du lessivage de nitrate), il serait intéressant de mettre en place une expérimentation couplant plusieurs techniques de suivi : traçage isotopique pour suivre l'azote provenant de l'engrais, mesure de la volatilisation

(N_2O et NH_3) et expérimentation sur des cases lysimétriques pour quantifier les pertes d'azote par lixiviation. Ce type d'étude permettrait d'avoir une vision globale de l'effet des biostimulants sur le devenir de l'azote du sol au cours d'une culture de blé.

II. Optimiser les apports de biostimulants pour accroitre les performances agronomiques

Parmi les défis concernant les biostimulants, l'optimisation des stades d'apport pour chaque culture est cruciale. Dans ces travaux de thèse, l'application des biostimulants a toujours été décidée en fonction du stade d'apport de l'engrais. Pour autant, les stades d'apports qui maximisent l'effet des biostimulants ne sont pas nécessairement ceux des fertilisants. De plus, il est probable que l'« engrais efficient » (engrais + biostimulant) soit plus efficace lorsque l'apport est décalé par rapport au fertilisant classique. En effet, en stimulant le métabolisme azoté du blé, les biostimulants améliorent l'EUA ce qui peut conduire à des besoins plus précoces ou tardifs en fonction des conditions pédoclimatiques. Quoi qu'il en soit, mettre en place des expérimentations avec des stades d'apport décalés par rapport aux pratiques habituelles serait un moyen efficace pour déterminer les meilleurs moments d'application de l'engrais efficient et répondre en partie aux objectifs des « 4R » (Cf. Chapitre II, Problématique et objectifs de recherche).

Par ailleurs, comme évoqué plus haut, les agriculteurs utilisent d'autres formes d'azote que celles étudiées durant ces travaux de thèse, notamment les fertilisants contenant du soufre tels que l'ammonium thiosulfate. En outre, malgré leur remise en cause, les inhibiteurs de l'uréase et de la nitrification sont de plus en plus utilisés en France afin de limiter la volatilisation des engrais. Comme les inhibiteurs ont un effet direct sur la volatilisation de l'engrais et que les formulations à base de Glutacétine® ont un effet indirect sur les pertes d'azote provenant du sol, l'usage de ces solutions pourrait être complémentaire. Elles pourraient être mélangées et ajoutées à tous les apports d'engrais azoté ou à l'inverse, une partie des applications d'azote pourrait s'effectuer avec les inhibiteurs tandis que les autres se feraient avec une formulation à base de Glutacétine®. Plus précisément, lorsque l'agriculteur apporte une importante quantité d'azote, il est probablement plus pertinent de le libérer progressivement grâce aux inhibiteurs. En revanche, lorsque de plus faibles quantités sont apportées, il semble plus logique de stimuler le métabolisme azoté de la plante afin d'absorber efficacement cet azote. Néanmoins, toutes les situations sont à envisager puisque

l'expérimentation au champ a montré que VNT4 est plus efficace lorsque la quantité de fertilisants azotés est élevée.

Même si le traçage au ^{15}N a montré que VNT4 ne permet pas d'absorber plus d'azote provenant du sol lorsque la parcelle est fertilisée, il serait utile d'appliquer les formulations à base de Glutacétine® sur des parcelles non fertilisées afin d'évaluer la capacité de ce biostimulant à promouvoir l'utilisation de l'azote du sol, notamment lié au précédent cultural (comme les légumineuses) et/ou aux apports organiques. Si les formulations sont efficaces dans ce contexte, leur efficacité serait alors détachée de l'apport de fertilisant minéral. La question de l'amélioration de l'efficience des fertilisants organiques grâce à ce type de formulations se pose donc aussi.

En parallèle, l'étude mettant en avant les effets des formulations à base de Glutacétine® sur les teneurs en hormones a aussi été l'opportunité de tester de nouvelles formulations ayant des performances semblables mais un coût plus faible pour l'agriculteur. Afin que les biostimulants soient rentables pour les agriculteurs, il semble donc indispensable de continuer le travail sur les formulations afin qu'elles soient performantes en termes de bilan agro-environnemental et économique pour l'ensemble de la filière.

III. Approfondir les recherches pour mieux comprendre l'impact des biostimulants dans la plante

Compte tenu des résultats obtenus dans ces travaux de thèse, la Glutacétine®, VNT4 ainsi que certaines nouvelles formulations (Figure V.2) semblent être les biostimulants les plus prometteurs. Dans l'objectif de mieux comprendre leur action sur la physiologie et le métabolisme de la plante, il apparait important de mettre en place des expérimentations dans lesquelles ces biostimulants sont appliqués seul en foliaire ou au sol. Le but serait donc d'évaluer l'effet de l'apport de ces formulations sur les transporteurs, les enzymes du métabolisme azoté et les teneurs en hormones. Des approches omiques telles que la protéomique pourraient aussi être envisagées afin d'affiner la caractérisation des effets biostimulants.

En outre, ces formulations ont montré des effets sur l'EUA mais aussi sur les teneurs en d'autres éléments dans le grain. L'étude de l'impact de ces formulations sur l'efficience d'usage d'autres nutriments ayant déjà été impactés par ces biostimulants (Mo, B, Se et Mn)

serait donc aussi judicieux. La mise en place d'un protocole simple en hydroponie dans lequel les plantes seraient en conditions limitantes pour ces éléments donneraient déjà des informations très précieuses.

Enfin, les formulations à base de Glutacétine® ont un fort impact sur la fertilité des épis et ainsi sur le nombre de grains par épi. L'amélioration des processus de fécondation des graines semble être l'un des effets majeurs de ces biostimulants. Il serait donc pertinent de vérifier l'hypothèse selon laquelle ces formulations fonctionnent sur d'autres plantes d'intérêt agronomique dont le produit de récolte est la graine. Les prochaines expérimentations devront prendre en compte cet aspect afin de confirmer ou infirmer cet effet des formulations à base de Glutacétine® sur d'autres plantes à fleurs telles que le colza, le lin oléagineux et le soja. Par ailleurs, l'application du biostimulant juste avant la floraison semble être le stade idoine pour optimiser cet effet comme cela a été constaté avec la Glutacétine® en foliaire sur le blé.

IV. Poursuivre le travail sur les outils de diagnostic

Concernant les outils de diagnostic, de nombreuses avancées ont été obtenues pour leur développement sur le blé mais il reste encore beaucoup à faire pour que ces appareils deviennent de véritables outils d'aide à la décision. Tout d'abord, le Multiplex® a pu être utilisé uniquement en serre puisqu'il a été possible de limiter les interférences grâce à un écran noir. Au champ, il faut donc continuer le travail débuté avec cet outil afin d'analyser les stades pendant lesquels les mesures sont représentatives du statut azoté du couvert végétal. Il faudra ensuite élaborer une calibration robuste permettant de corréler l'indice NBI-or du Multiplex avec l'indice de nutrition azotée (INN) à différents stades représentatifs. Puis, l'analyse des données sera un moyen d'identifier les possibilités de prédiction du rendement et de la teneur en protéines du blé à la récolte. Ces prédictions seraient un moyen de développer un outil facilitant la gestion du statut azoté du blé tendre tout en optimisant l'EUA et les performances agronomiques.

L'utilisation du XRF a par ailleurs été fortement développée sur le blé. Les calibrations obtenues dans le cadre de cette thèse donnent aujourd'hui accès à une partie du ionome de la farine et la paille en très peu de temps (64 secondes par analyse). Il semble tout de même nécessaire de compléter ce jeu de données avec des échantillons contrastées en termes de

variétés, fertilisations et conditions climatiques afin de renforcer la robustesse des calibrations. Le travail avec cet outil pourrait être étendu à la feuille drapeau. En effet, des mesures XRF *in situ* ou *in planta* sur des feuilles drapeaux intactes ou fraichement prélevées permettent d'accéder à la teneur relative en plusieurs éléments. Il est maintenant nécessaire d'approfondir ce travail afin de valider si une mesure sur feuille fraiche est représentative de l'ensemble de la feuille, des parties aériennes et/ou de la plante entière. De même que pour le Multiplex®, le système XRF pourrait être un moyen d'ajuster la fertilisation de fin de cycle et/ou de prédire le ionome du grain à maturité. Concrètement, il sera peut-être possible prochainement de faire une analyse XRF sur la feuille drapeau puis d'apporter un engrais spécifique en fonction du résultat de cette analyse dans le but d'atteindre une valeur nutritionnelle minimale du blé. Il pourrait s'agir alors d'une innovation de rupture pour la filière qui pourrait conditionner le prix du blé en fonction de sa teneur en nutriments.

Enfin, l'emploi de la technologie NIRS est complémentaire aux deux précédents outils. Les premiers développements effectués dans le cadre de cette thèse montrent son intérêt uniquement pour la gestion de la nutrition azotée. Pourtant, le potentiel de la spectrométrie proche infra-rouge est considérable. Il est probablement possible de lier les spectres NIRS de feuilles et de grains de blé à bien d'autres paramètres. Il pourrait ainsi venir en soutien du système XRF pour prédire des teneurs en éléments que ce dernier ne détecte pas. Le NIRS pourrait aussi permettre de déterminer d'autres critères nutritionnels d'intérêts pour la filière comme les teneurs en gluten, en gliadines, en phytates, en cadmium, etc.

Les systèmes XRF et NIRS portables ont l'avantage de pouvoir fonctionner quelle que soit la matrice (feuille intacte, poudre végétale, extrait liquide...). Ils pourront à terme être transférés vers d'autres cultures pour déterminer le statut nutritionnel, le profil ionomique ou la quantification de divers composés biochimiques d'intérêt. Leur utilisation pour déterminer les caractéristiques des sols serait également très pertinente dans un objectif d'amélioration des performances agronomiques au sens large.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abalos, D., Jeffery, S., Sanz-Cobena, A., Guardia, G., Vallejo, A., **2014**. Meta-analysis of the effect of urease and nitrification inhibitors on crop productivity and nitrogen use efficiency. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 189, 136–144. https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.03.036

Abbate, P.E., Andrade, F.H., Culot, J.P., **1995**. The effects of radiation and nitrogen on number of grains in wheat. *The Journal of Agricultural Science* 124, 351. https://doi.org/10.1017/S0021859600073317

Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Zia-ur-Rehman, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., Qayyum, M.F., Irshad, M.K., **2015**. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119, 186–197. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.011

Agarwal, P., Khurana, P., **2020**. TaZnF, a C3HC4 type RING zinc finger protein from *Triticum aestivum* is involved in dehydration and salinity stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 29, 395–406. https://doi.org/10.1007/s13562-019-00546-8

Ahuja, G., Jaiswal, S., Hucl, P., Chibbar, R.N., **2014**. Wheat genome specific granule-bound starch synthase I differentially influence grain starch synthesis. *Carbohydrate Polymers* 114, 87–94. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.004

Aires, A., Carvalho, R., Rosa, E.A.S., Saavedra, M.J., **2013**. Effects of agriculture production systems on nitrate and nitrite accumulation on baby-leaf salads. *Food Science & Nutrition* 1, 3–7. https://doi.org/10.1002/fsn3.1

Ajiboye, B., Cakmak, I., Paterson, D., de Jonge, M.D., Howard, D.L., Stacey, S.P., Torun, A.A., Aydin, N., McLaughlin, M.J., **2015**. X-ray fluorescence microscopy of zinc localization in wheat grains biofortified through foliar zinc applications at different growth stages under field conditions. *Plant Soil* 392, 357–370. https://doi.org/10.1007/s11104-015-2467-8

Akiyama, H., Yan, X., Yagi, K., **2010**. Evaluation of effectiveness of enhanced-efficiency fertilizers as mitigation options for N_2O and NO emissions from agricultural soils: meta-analysis. *Global Change Biology* 16, 1837–1846. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.02031.x

Alber, T.C., Davenport, R.C., Giammona, D.A., Lolis, E., Petsko, G.A., Ringe, D., **1987**. Crystallography and site-directed mutagenesis of yeast triosephosphate isomerase: what can we learn about catalysis from a “simple” enzyme? *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 52, 603–613. https://doi.org/10.1101/sqb.1987.052.01.069

Ali, Q., Perveen, R., El-Esawi, M.A., Ali, S., Hussain, S.M., Amber, M., Iqbal, N., Rizwan, M., Alyemeni, M.N., El-Serehy, H.A., Al-Misned, F.A., Ahmad, P., **2020**. Low Doses of *Cuscuta reflexa* Extract Act as Natural Biostimulants to Improve the Germination Vigor, Growth, and Grain Yield of Wheat Grown under Water Stress: Photosynthetic Pigments, Antioxidative Defense Mechanisms, and Nutrient Acquisition. *Biomolecules* 10, 1212. https://doi.org/10.3390/biom10091212

Allard, V., Martre, P., Le Gouis, J., **2013**. Genetic variability in biomass allocation to roots in wheat is mainly related to crop tillering dynamics and nitrogen status. *European Journal of Agronomy* 46, 68–76. https://doi.org/10.1016/j.eja.2012.12.004

Almadi, L., Paoletti, A., Cinosi, N., Daher, E., Rosati, A., Di Vaio, C., Famiani, F., **2020**. A Biostimulant Based on Protein Hydrolysates Promotes the Growth of Young Olive Trees. *Agriculture* 10, 618. https://doi.org/10.3390/agriculture10120618

Almagro, A., Lin, S.H., Tsay, Y.F., **2008**. Characterization of the Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.6 Reveals a Role of Nitrate in Early Embryo Development. *The Plant Cell Online* 20, 3289–3299. https://doi.org/10.1105/tpc.107.056788

Altenbach, S.B., Chang, H.-C., Rowe, M.H., Yu, X.B., Simon-Buss, A., Seabourn, B.W., Green, P.H., Alaedini, A., **2020**. Reducing the Immunogenic Potential of Wheat Flour: Silencing of Alpha Gliadin Genes in a U.S. Wheat Cultivar. *Frontiers in Plant Science* 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00020

Altenbach, S.B., DuPont, F.M., Kothari, K.M., Chan, R., Johnson, E.L., Lieu, D., **2003**. Temperature, Water and Fertilizer Influence the Timing of Key Events During Grain Development in a US Spring Wheat. *Journal of Cereal Science* 37, 9–20. https://doi.org/10.1006/jcrs.2002.0483

Altenbach, S.B., Tanaka, C.K., Hurkman, W.J., Whitehand, L.C., Vensel, W.H., Dupont, F.M., **2011**. Differential effects of a post-anthesis fertilizer regimen on the wheat flour proteome determined by quantitative 2-DE. *Proteome Science* 9, 46. https://doi.org/10.1186/1477-5956-9-46

Anderson, W.K., Garlinge, J.R., **2000**. The Wheat book : principles and practice. Department of Agriculture and Food, Western Australia, *Perth*. Bulletin 4443.

Angelina, E., Papatheodorou, E.M., Demirtzoglou, T., Monokrousos, N., **2020**. Effects of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* Inoculation on Attributes of the Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Soil Rhizosphere Microbial Community: The Role of the Management System. *Agronomy* 10, 1428. https://doi.org/10.3390/agronomy10091428

ANSES, **2019**. Avis de l'Anses relatif à une demande d'évaluation de l'utilisation des inhibiteurs d'uréase et de nitrification au regard des risques pour l'environnement, pour les applicateurs et pour les consommateurs. https://www.anses.fr/ (accessed 11.03.20).

Aranguren, M., Castellón, A., Aizpurua, A., **2021**. Wheat Grain Protein Content under Mediterranean Conditions Measured with Chlorophyll Meter. *Plants* 10, 374. https://doi.org/10.3390/plants10020374

Aranguren, M., Castellón, A., Aizpurua, A., **2020**. Crop Sensor Based Non-destructive Estimation of Nitrogen Nutritional Status, Yield, and Grain Protein Content in Wheat. *Agriculture* 10, 148. https://doi.org/10.3390/agriculture10050148

Arazuri, S., Ignacio Arana, J., Arias, N., Arregui, L.M., Gonzalez-Torralba, J., Jaren, C., **2012**. Rheological parameters determination using Near Infrared technology in whole wheat grain. *Journal of Food Engineering* 111, 115–121. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.017

Arena, S., D'Ambrosio, C., Vitale, M., Mazzeo, F., Mamone, G., Di Stasio, L., Maccaferri, M., Curci, P.L., Sonnante, G., Zambrano, N., Scaloni, A., **2017**. Differential representation of albumins and globulins during grain development in durum wheat and its possible functional consequences. *Journal of Proteomics* 162, 86–98. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.05.004

Arshi, A., Abdin, M.Z., Iqbal, M., **2006**. Effect of $CaCl_2$ on growth performance, photosynthetic efficiency and nitrogen assimilation of *Cichorium intybus* L. grown under NaCl stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 28, 137–147. https://doi.org/10.1007/s11738-006-0040-z

Arslan, E., Agar, G., Aydin, M., **2021**. Humic Acid as a Biostimulant in Improving Drought Tolerance in Wheat: the Expression Patterns of Drought-Related Genes. *Plant Molecular Biology Reporter*. https://doi.org/10.1007/s11105-020-01266-3

Artola, E., Cruchaga, S., Ariz, I., Moran, J.F., Garnica, M., Houdusse, F., Mina, J.M.G., Irigoyen, I., Lasa, B., Aparicio-Tejo, P.M., **2011**. Effect of N-(n-butyl) thiophosphoric triamide on urea metabolism and the assimilation of ammonium by *Triticum aestivum* L. *Plant Growth Regulation* 63, 73–79. https://doi.org/10.1007/s10725-010-9513-6

Asthir, B., Kaur, S., Spoor, W., Roitsch, T., **2010**. Spatial and temporal dynamics of peroxidase and amine oxidase activity is linked to polyamines and lignin in wheat grains. *Biologia plantarum* 54, 525–529. https://doi.org/10.1007/s10535-010-0092-1

Aula, L., Omara, P., Nambi, E., Oyebiyi, F.B., Raun, W.R., **2020**. Review of Active Optical Sensors for Improving Winter Wheat Nitrogen Use Efficiency. *Agronomy* 10, 1157. https://doi.org/10.3390/agronomy10081157

Aussenac, T., Rhazi, L., Branlard, G., **2020**. Molecular Weight Distribution of Polymeric Proteins in Wheat Grains: The Rheologically Active Polymers. *Foods* 9, 1675. https://doi.org/10.3390/foods9111675

Avice, J.-C., Etienne, P., **2014**. Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* 65, 3813–3824. https://doi.org/10.1093/jxb/eru177

B

Bahal, G., Sudha, M.L., Ramasarma, P.R., **2013**. Wheat Germ Lipoxygenase: Its Effect on Dough Rheology, Microstructure, and Bread Making Quality. *International Journal of Food Properties* 16, 1730–1739. https://doi.org/10.1080/10942912.2011.607932

Baillot, N., Girousse, C., Allard, V., Piquet-Pissaloux, A., Gouis, J.L., **2018**. Different grain-filling rates explain grain-weight differences along the wheat ear. *PLOS ONE* 13, e0209597. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209597

Bajgain, P., Russell, B., Mohammadi, M., **2018**. Phylogenetic analyses and in-seedling expression of ammonium and nitrate transporters in wheat. *Scientific Reports* 8. https://doi.org/10.1038/s41598-018-25430-8

Bancel, E., Bonnot, T., Davanture, M., Alvarez, D., Zivy, M., Martre, P., Déjean, S., Ravel, C., **2019**. Proteomic Data Integration Highlights Central Actors Involved in Einkorn (*Triticum monococcum* ssp. monococcum) Grain Filling in Relation to Grain Storage Protein Composition. *Frontiers in Plant Science* 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00832

Barak, S., Mudgil, D., Khatkar, B.S., **2013**. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. *LWT - Food Science and Technology* 51, 211–217. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.011

Barbottin, A., Lecomte, C., Bouchard, C., Jeuffroy, M.-H., **2005**. Nitrogen Remobilization during Grain Filling in Wheat. *Crop Science* 45, 1141. https://doi.org/10.2135/cropsci2003.0361

Barneix, A.J., **2007**. Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. *Journal of Plant Physiology* 164, 581–590. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.03.009

Barraclough, P.B., Howarth, J.R., Jones, J., Lopez-Bellido, R., Parmar, S., Shepherd, C.E., Hawkesford, M.J., **2010**. Nitrogen efficiency of wheat: Genotypic and environmental variation and prospects for improvement. *European Journal of Agronomy* 33, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.eja.2010.01.005

Barraclough, P.B., Lopez-Bellido, R., Hawkesford, M.J., **2014**. Genotypic variation in the uptake, partitioning and remobilisation of nitrogen during grain-filling in wheat. *Field Crops Research* 156, 242–248. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.10.004

Barro, F., Rooke, L., Békés, F., Gras, P., Tatham, A.S., Fido, R., Lazzeri, P.A., Shewry, P.R., Barceló, P., **1997**. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nature Biotechnology* 15, 1295–1299. https://doi.org/10.1038/nbt1197-1295

Barron, C., Surget, A., Rouau, X., **2007**. Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal Science* 45, 88–96. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.07.004

Başlar, M., Ertugay, M.F., **2011**. Determination of protein and gluten quality-related parameters of wheat flour using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 35, 139–144.

Bavaresco, L., Lucini, L., Squeri, C., Zamboni, M., Frioni, T., **2020**. Protein hydrolysates modulate leaf proteome and metabolome in water-stressed grapevines. *Scientia Horticulturae* 109413. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109413

Becker-Ritt, A.B., Martinelli, A.H.S., Mitidieri, S., Feder, V., Wassermann, G.E., Santi, L., Vainstein, M.H., Oliveira, J.T.A., Fiuza, L.M., Pasquali, G., Carlini, C.R., **2007**. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon* 50, 971–983. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.008

Ben Saad, R., Ben Halima, N., Ghorbel, M., Zouari, N., Ben Romdhane, W., Guiderdoni, E., Al-Doss, A., Hassairi, A., **2018**. AlSRG1, a novel gene encoding an RRM-type RNA-binding protein (RBP) from *Aeluropus littoralis*, confers salt and drought tolerance in transgenic tobacco. *Environmental and Experimental Botany* 150, 25–36. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.03.002

Ben Slimane, R., Bancal, P., Bancal, M.-O., **2013**. Down-regulation by stems and sheaths of grain filling with mobilized nitrogen in wheat. *Field Crops Research* 140, 59–68. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.10.006

Bernard, S.M., Habash, D.Z., **2009**. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling: Research reviews. *New Phytologist* 182, 608–620. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02823.x

Bernard, S.M., Møller, A.L.B., Dionisio, G., Kichey, T., Jahn, T.P., Dubois, F., Baudo, M., Lopes, M.S., Tercé-Laforgue, T., Foyer, C.H., Parry, M.A.J., Forde, B.G., Araus, J.L., Hirel, B., Schjoerring, J.K., Habash, D.Z., **2008**. Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Molecular Biology* 67, 89–105. https://doi.org/10.1007/s11103-008-9303-y

Bessou, C., Mary, B., Léonard, J., Roussel, M., Gréhan, E., Gabrielle, B., **2010**. Modelling soil compaction impacts on nitrous oxide emissions in arable fields. *European Journal of Soil Science* 61, 348–363. https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2010.01243.x

Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman, H., Dean, C., Bergkamp, R., Dirkse, W., Van Staveren, M., Stiekema, W., Drost, L., Ridley, P., Hudson, S.A., Patel, K., Murphy, G., Piffanelli, P., Wedler, H., Wedler, E., Wambutt, R., Weitzenegger, T., Pohl, T.M., Terryn, N., Gielen, J., Villarroel, R., De Clerck, R., Van Montagu, M., Lecharny, A., Auborg, S., Gy, I., Kreis, M., Lao, N., Kavanagh, T., Hempel, S., Kotter, P., Entian, K.D., Rieger, M., Schaeffer, M., Funk, B., Mueller-Auer, S., Silvey, M., James, R., Montfort, A., Pons, A., Puigdomenech, P., Douka, A., Voukelatou, E., Milioni, D., Hatzopoulos, P., Piravandi, E., Obermaier, B., Hilbert, H., Düsterhöft, A., Moores, T., Jones, J.D., Eneva, T., Palme, K.,

Benes, V., Rechman, S., Ansorge, W., Cooke, R., Berger, C., Delseny, M., Voet, M., Volckaert, G., Mewes, H.W., Klosterman, S., Schueller, C., Chalwatzis, N., **1998**. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 391, 485–488. https://doi.org/10.1038/35140

Bharti, K., **2018**. Improving nutritional quality of wheat through soil and foliar zinc application. *Plant, Soil and Environment* 59: 348-352.

Bielski, S., Romaneckas, K., Šarauskis, E., **2020**. Impact of Nitrogen and Boron Fertilization on Winter Triticale Productivity Parameters. *Agronomy* 10, 279. https://doi.org/10.3390/agronomy10020279

Bijay-Singh, Ali, A.M., **2020**. Using Hand-Held Chlorophyll Meters and Canopy Reflectance Sensors for Fertilizer Nitrogen Management in Cereals in Small Farms in Developing Countries. *Sensors* 20, 1127. https://doi.org/10.3390/s20041127

Bogard, M., **2011**. Analyse génétique et écophysiologique de l'écart à la relation teneur en protéines - rendement en grains chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.).

Bogard, M., Allard, V., Brancourt-Hulmel, M., Heumez, E., Machet, J.-M., Jeuffroy, M.-H., Gate, P., Martre, P., Le Gouis, J., **2010**. Deviation from the grain protein concentration–grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany* 61, 4303–4312. https://doi.org/10.1093/jxb/erq238

Bogard, M., Jourdan, M., Allard, V., Martre, P., Perretant, M.R., Ravel, C., Heumez, E., Orford, S., Snape, J., Griffiths, S., Gaju, O., Foulkes, J., Le Gouis, J., **2011**. Anthesis date mainly explained correlations between post-anthesis leaf senescence, grain yield, and grain protein concentration in a winter wheat population segregating for flowering time QTLs. *Journal of Experimental Botany* 62, 3621–3636. https://doi.org/10.1093/jxb/err061

Bohner, A., Kojima, S., Hajirezaei, M., Melzer, M., von Wirén, N., **2015**. Urea retranslocation from senescing *Arabidopsis* leaves is promoted by DUR3-mediated urea retrieval from leaf apoplast. *The Plant Journal* 81, 377–387. https://doi.org/10.1111/tpj.12740

Boisson, M., Mondon, K., Torney, V., Nicot, N., Laine, A.-L., Bahrman, N., Gouy, A., Daniel-Vedele, F., Hirel, B., Sourdille, P., Dardevet, M., Ravel, C., Le Gouis, J., **2005**. Partial sequences of nitrogen metabolism genes in hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 110, 932–940. https://doi.org/10.1007/s00122-004-1913-4

Bonafede, M.D., Tranquilli, G., Pflüger, L.A., Peña, R.J., Dubcovsky, J., **2015**. Effect of allelic variation at the Glu-3/Gli-1 loci on breadmaking quality parameters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science* 62, 143–150. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.02.001

Bonnot, T., Bancel, E., Alvarez, D., Davanture, M., Boudet, J., Pailloux, M., Zivy, M., Ravel, C., Martre, P., **2017**. Grain subproteome responses to nitrogen and sulfur supply in diploid wheat *Triticum monococcum* ssp. monococcum. *The Plant Journal* 91, 894–910. https://doi.org/10.1111/tpj.13615

Boulogne, I., **2020**. Glycomolécules et défense des plantes : des stimulateurs de défense aux biostimulants. Habilitation à diriger des recherches.

Boulogne, I., Petit, P., Ozier-Lafontaine, H., Desfontaines, L., Loranger-Merciris, G., **2012**. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 10, 325–347. https://doi.org/10.1007/s10311-012-0359-1

Bradford, M.M., **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Brancourt-Hulmel, M., Doussinault, G., Lecomte, C., **2003**. Genetic Improvement of Agronomic Traits of Winter Wheat Cultivars Released in France from 1946 to 1992. Crop Science 43, 9.

Bravo, S., Amorós, J.A., Pérez-de-los-Reyes, C., García, F.J., Moreno, M.M., Sánchez-Ormeño, M., Higueras, P., **2017**. Influence of the soil pH in the uptake and bioaccumulation of heavy metals (Fe, Zn, Cu, Pb and Mn) and other elements (Ca, K, Al, Sr and Ba) in vine leaves, Castilla-La Mancha (Spain). *Journal of Geochemical Exploration, Remediation of Polluted Soils* - Part 1 174, 79–83. https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2015.12.012

Brier, N.D., Gomand, S.V., Donner, E., Paterson, D., Delcour, J.A., Lombi, E., Smolders, E., **2015**. Distribution of Minerals in Wheat Grains (*Triticum aestivum* L.) and in Roller Milling Fractions Affected by Pearling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 1276–1285. https://doi.org/10.1021/jf5055485

Brisson, N., Gate, P., Gouache, D., Charmet, G., Oury, F.-X., Huard, F., **2010**. Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. *Field Crops Research* 119, 201–212. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.07.012

Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A., **2007**. Zinc in plants. *New Phytologist* 173, 677–702. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x

Brocklehurst, P.A., **1977**. Factors controlling grain weight in wheat. *Nature* 266, 348–349. https://doi.org/10.1038/266348a0

Brown, K.H., Rivera, J.A., Bhutta, Z., Gibson, R.S., King, J.C., Lönnerdal, B., Ruel, M.T., Sandtröm, B., Wasantwisut, E., Hotz, C., **2004**. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food and Nutrition Bulletin* 25, S99-203.

Buchner, P., Hawkesford, M.J., **2014**. Complex phylogeny and gene expression patterns of members of the NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family (NPF) in wheat. *Journal of Experimental Botany* 65, 5697–5710. https://doi.org/10.1093/jxb/eru231

Bücking, H., Kafle, A., **2015**. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Nitrogen Uptake of Plants: Current Knowledge and Research Gaps. *Agronomy* 5, 587–612. https://doi.org/10.3390/agronomy5040587

Bustos, D.V., Hasan, A.K., Reynolds, M.P., Calderini, D.F., **2013**. Combining high grain number and weight through a DH-population to improve grain yield potential of wheat in high-yielding environments. *Field Crops Research* 145, 106–115. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.01.015

Butphu, S., Rasche, F., Cadisch, G., Kaewpradit, W., **2020**. Eucalyptus biochar application enhances Ca uptake of upland rice, soil available P, exchangeable K, yield, and N use efficiency of sugarcane in a crop rotation system. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 183, 58–68. https://doi.org/10.1002/jpln.201900171

C

Cai, Z., Gao, S., Xu, M., Hanson, B.D., **2018**. Evaluation of potassium thiosulfate as a nitrification inhibitor to reduce nitrous oxide emissions. *Science of The Total Environment* 618, 243–249. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.274

Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J.W., **2014**. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383, 3–41. https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8

Camañes, G., Bellmunt, E., García-Andrade, J., García-Agustín, P., Cerezo, M., **2012**. Reciprocal regulation between AtNRT2.1 and AtAMT1.1 expression and the kinetics of NH_4^+ and NO_3^-

influxes. *Journal of Plant Physiology* 169, 268–274. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.10.011

Canivenc, G., **2005**. Caractérisation du rôle de gènes PTR d'*Arabidopsis thaliana* dans le transport de NO_3^-. Thèse de l'Université de Montpellier II.

Caporaso, N., Whitworth, M.B., Fisk, I.D., **2018**. Near-Infrared spectroscopy and hyperspectral imaging for non-destructive quality assessment of cereal grains. *Applied Spectroscopy Reviews* 53, 667–687. https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1425214

Carciochi, W.D., Divito, G.A., Fernández, L.A., Echeverría, H.E., **2017**. Sulfur affects root growth and improves nitrogen recovery and internal efficiency in wheat. *Journal of Plant Nutrition* 40, 1231–1242. https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1187740

Cardarelli, M., Rouphael, Y., Coppa, E., Hoagland, L., Colla, G., **2020**. Using Microgranular-Based Biostimulant in Vegetable Transplant Production to Enhance Growth and Nitrogen Uptake. *Agronomy* 10, 842. https://doi.org/10.3390/agronomy10060842

Carillo, P., Colla, G., El-Nakhel, C., Bonini, P., D'Amelia, L., Dell'Aversana, E., Pannico, A., Giordano, M., Sifola, M.I., Kyriacou, M.C., De Pascale, S., Rouphael, Y., **2019**. Biostimulant Application with a Tropical Plant Extract Enhances *Corchorus olitorius* Adaptation to Sub-Optimal Nutrient Regimens by Improving Physiological Parameters. *Agronomy* 9, 249. https://doi.org/10.3390/agronomy9050249

Carmody, N., Goñi, O., Łangowski, Ł., O'Connell, S., **2020**. *Ascophyllum nodosum* Extract Biostimulant Processing and Its Impact on Enhancing Heat Stress Tolerance During Tomato Fruit Set. Frontiers in Plant Science 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00807

Cartelat, A., Cerovic, Z.G., Goulas, Y., Meyer, S., Lelarge, C., Prioul, J.-L., Barbottin, A., Jeuffroy, M.-H., Gate, P., Agati, G., Moya, I., **2005**. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research* 91, 35–49. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.05.002

Casa, R., Castaldi, F., Pascucci, S., Pignatti, S., **2015**. Chlorophyll estimation in field crops: an assessment of handheld leaf meters and spectral reflectance measurements. *The Journal of Agricultural Science* 153, 876–890. https://doi.org/10.1017/S0021859614000483

Casadesús, A., Pérez-Llorca, M., Munné-Bosch, S., Polo, J., **2020**. An Enzymatically Hydrolyzed Animal Protein-Based Biostimulant (Pepton) Increases Salicylic Acid and Promotes Growth of Tomato Roots Under Temperature and Nutrient Stress. *Frontiers in Plant Science* 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00953

Casartelli, A., Melino, V.J., Baumann, U., Riboni, M., Suchecki, R., Jayasinghe, N.S., Mendis, H., Watanabe, M., Erban, A., Zuther, E., Hoefgen, R., Roessner, U., Okamoto, M., Heuer, S., **2019**. Opposite fates of the purine metabolite allantoin under water and nitrogen limitations in bread wheat. *Plant Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/s11103-019-00831-z

Castellano-Hinojosa, A., Correa-Galeote, D., González-López, J., Bedmar, E.J., **2019**. Effect of nitrogen fertilisers on nitrous oxide emission, nitrifier and denitrifier abundance and bacterial diversity in closed ecological systems. *Applied Soil Ecology* 103380. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103380

Castellano-Hinojosa, A., González-López, J., Vallejo, A., Bedmar, E.J., **2020**. Effect of urease and nitrification inhibitors on ammonia volatilization and abundance of N-cycling genes in an agricultural soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. https://doi.org/10.1002/jpln.201900038

Celletti, S., Astolfi, S., Guglielmo, N., Colla, G., Cesco, S., Mimmo, T., **2020**. Evaluation of a Legume-Derived Protein Hydrolysate to Mitigate Iron Deficiency in Plants. *Agronomy* 10, 1942. https://doi.org/10.3390/agronomy10121942

Chatterjee, A., **2018**. Additions of ammonium sulfate and urease inhibitor with urea to improve spring wheat and sugar beet yield. *Archives of Agronomy and Soil Science* 64, 1459–1464. https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1436762

Chen, D., Cao, B., Wang, S., Liu, P., Deng, X., Yin, L., Zhang, S., **2016**. Silicon moderated the K deficiency by improving the plant-water status in sorghum. *Scientific Reports* 6. https://doi.org/10.1038/srep22882

Chen, J., Zhu, S., Zhao, G., **2017**. Rapid determination of total protein and wet gluten in commercial wheat flour using siSVR-NIR. *Food Chemistry* 221, 1939–1946. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.155

Chen, M., Penfield, S., **2018**. Feedback regulation of COOLAIR expression controls seed dormancy and flowering time. *Science* 360, 1014–1017. https://doi.org/10.1126/science.aar7361

Chen, X.-P., Zhang, Y.-Q., Tong, Y.-P., Xue, Y.-F., Liu, D.-Y., Zhang, W., Deng, Y., Meng, Q.-F., Yue, S.-C., Yan, P., Cui, Z.-L., Shi, X.-J., Guo, S.-W., Sun, Y.-X., Ye, Y.-L., Wang, Z.-H., Jia, L.-L., Ma, W.-Q., He, M.-R., Zhang, X.-Y., Kou, C.-L., Li, Y.-T., Tan, D.-S., Cakmak, I., Zhang, F.-S., Zou, C.-Q., **2017**. Harvesting more grain zinc of wheat for human health. *Scientific Reports* 7, 7016. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07484-2

Chen, X.Y., Cao, X.Y., Zhang, Y.J., Islam, S., Zhang, J.J., Yang, R.C., Liu, J.J., Li, G.Y., Appels, R., Keeble-Gagnere, G., Ji, W.Q., He, Z.H., Ma, W.J., **2016**. Genetic characterization of cysteine-rich type-b avenin-like protein coding genes in common wheat. *Scientific Reports* 6, 1–12. https://doi.org/10.1038/srep30692

Chiaiese, P., Corrado, G., Colla, G., Kyriacou, M.C., Rouphael, Y., **2018**. Renewable Sources of Plant Biostimulation: Microalgae as a Sustainable Means to Improve Crop Performance. *Frontiers in Plant Science* 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01782

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 and Cell Physiology* 45, 1139–1148. https://doi.org/10.1093/pcp/pch143

Ciccolini, V., Pellegrino, E., Coccina, A., Fiaschi, A.I., Cerretani, D., Sgherri, C., Quartacci, M.F., Ercoli, L., **2017**. Biofortification with Iron and Zinc Improves Nutritional and Nutraceutical Properties of Common Wheat Flour and Bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 5443–5452. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01176

Citepa, **2018**. Les composés atmosphériques de l'azote NOx, NH_3, N_2O Des défis à court terme.

Clemente, A., Arques, M. del C., **2014**. Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. *World Journal of Gastroenterology* 20, 10305–10315. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i30.10305

Cohan, J.-P., Le Souder, C., Guicherd, C., Lorgeou, J., Du Cheyron, P., Bonnefoy, M., Decarrier, A., Piraux, F., Laurent, F., **2019**. Combining breeding traits and agronomic indicators to characterize the impact of cultivar on the nitrogen use efficiency of bread wheat. *Field Crops Research* 242, 107588. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.107588

Coleto, I., de la Peña, M., Rodríguez-Escalante, J., Bejarano, I., Glauser, G., Aparicio-Tejo, P.M., González-Moro, M.B., Marino, D., **2017**. Leaves play a central role in the adaptation of nitrogen and sulfur metabolism to ammonium nutrition in oilseed rape (*Brassica napus*). *BMC Plant Biology* 17, 157. https://doi.org/10.1186/s12870-017-1100-9

Colla, G., Hoagland, L., Ruzzi, M., Cardarelli, M., Bonini, P., Canaguier, R., Rouphael, Y., **2017**. Biostimulant Action of Protein Hydrolysates: Unraveling Their Effects on Plant Physiology and Microbiome. *Frontiers in Plant Science* 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02202

Colla, G., Rouphael, Y., **2020**. Microalgae: New Source of Plant Biostimulants. *Agronomy* 10, 1240. https://doi.org/10.3390/agronomy10091240

Colla, G., Rouphael, Y., **2015**. Biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, Biostimulants in Horticulture 196, 1–2. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.044

Colla, G., Rouphael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., Cardarelli, M., **2014**. Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers in Plant Science* 5, 448. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00448

Comité français d'étude et de développement de la fertilisation raisonnée, **2000**. Calcul de la fertilisation azotée, COMIFER. *Acta* (Paris).

Commission Regulation, **2006**. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. *Official Journal of the European Union* 364, 5–24.

Connorton, J.M., Jones, E.R., Rodríguez-Ramiro, I., Fairweather-Tait, S., Uauy, C., Balk, J., **2017**. Wheat Vacuolar Iron Transporter TaVIT2 Transports Fe and Mn and Is Effective for Biofortification. *Plant Physiology* 174, 2434–2444. https://doi.org/10.1104/pp.17.00672

Cormier, F., Foulkes, J., Hirel, B., Gouache, D., Moënne-Loccoz, Y., Gouis, J.L., **2016**. Breeding for increased nitrogen-use efficiency: a review for wheat (*T. aestivum* L.). *Plant Breeding* 135, 255–278. https://doi.org/10.1111/pbr.12371

Coruzzi, G.M., **2003**. Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* 2, e0010. https://doi.org/10.1199/tab.0010

Court, M.N., Stephen, R.C., Waid, J.S., **1964**. TOXICITY AS A CAUSE OF THE INEFFICIENCY OF UREA AS A FERTILIZER: II. EXPERIMENTAL. *Journal of Soil Science* 15, 49–65. https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1964.tb00244.x

Cowan, N., Levy, P., Moring, A., Simmons, I., Bache, C., Stephens, A., Marinheiro, J., Brichet, J., Song, L., Pickard, A., McNeill, C., McDonald, R., Maire, J., Loubet, B., Voylokov, P., Sutton, M., Skiba, U., **2019**. Nitrogen use efficiency and N_2O and NH_3 losses attributed to three fertiliser types applied to an intensively managed silage crop. *Biogeosciences Discussions* 1–27. https://doi.org/10.5194/bg-2019-90

Criado, M.V., Caputo, C., Roberts, I.N., Castro, M.A., Barneix, A.J., **2009**. Cytokinin-induced changes of nitrogen remobilization and chloroplast ultrastructure in wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Physiology* 166, 1775–1785. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.05.007

Criado, M.V., H. Gutierrez Boem, F., Roberts, I.N., Caputo, C., **2015**. Post-anthesis N and P dynamics and its impact on grain yield and quality in mycorrhizal barley plants. *Mycorrhiza* 25, 229–235. https://doi.org/10.1007/s00572-014-0604-5

Croft, H., Chen, J.M., **2018**. 3.09 - Leaf Pigment Content. *Comprehensive Remote Sensing*. Elsevier, Oxford, pp. 117–142. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10547-0

Crosbie, G.B., Osborne, B.G., Wesley, I.J., Adriansz, T.D., **2007**. Screening of Wheat for Flour Swelling Volume by Near-Infrared Spectroscopy. *Cereal Chemistry* 84, 379–383. https://doi.org/10.1094/CCHEM-84-4-0379

Cu, S.T., Guild, G., Nicolson, A., Velu, G., Singh, R., Stangoulis, J., **2020**. Genetic dissection of zinc, iron, copper, manganese and phosphorus in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and rachis at two developmental stages. *Plant Science* 291, 110338. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110338

Curtis, T., Halford, N.G., **2014**. Food security: the challenge of increasing wheat yield and the importance of not compromising food safety. *Annals of Applied Biology* 164, 354–372. https://doi.org/10.1111/aab.12108

D

Daba, S.D., Liu, X., Aryal, U., Mohammadi, M., **2020**. A proteomic analysis of grain yield-related traits in wheat. *AoB Plants* 12, plaa042. https://doi.org/10.1093/aobpla/plaa042

Dai, Z., Plessis, A., Vincent, J., Duchateau, N., Besson, A., Dardevet, M., Prodhomme, D., Gibon, Y., Hilbert, G., Pailloux, M., Ravel, C., Martre, P., **2015**. Transcriptional and metabolic alternations rebalance wheat grain storage protein accumulation under variable nitrogen and sulfur supply. *The Plant Journal* 83, 326–343. https://doi.org/10.1111/tpj.12881

Daldoul, S., Toumi, I., Reustle, G.M., Krczal, G., Ghorbel, A., Mliki, A., Höfer, M.U., **2012**. Molecular cloning and characterisation of a cDNA encoding a putative alkaline alpha-galactosidase from grapevine (*Vitis vinifera* L.) that is differentially expressed under osmotic stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 34, 891–903. https://doi.org/10.1007/s11738-011-0887-5

Daly, M., Bromilow, S.N., Nitride, C., Shewry, P.R., Gethings, L.A., Mills, E.N.C., **2020**. Mapping Coeliac Toxic Motifs in the Prolamin Seed Storage Proteins of Barley, Rye, and Oats Using a Curated Sequence Database. *Frontiers in Nutrition* 7, 87. https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00087

Das, A., Ray, R., Mandal, N., Chakrabarti, K., **2016**. An analysis of transcripts and enzyme profiles in drought stressed jute (*Corchorus capsularis*) and rice (*Oryza sativa*) seedlings treated with CaCl2, hydroxyapatite nano-particle and β-amino butyric acid. *Plant Growth Regulation* 79, 401–412. https://doi.org/10.1007/s10725-015-0144-9

Dawar, K., Khan, H., Zaman, M., Muller, C., Alam, S.S., Fahad, S., Alwahibi, M.S., Alkahtani, J., Saeed, B., Saud, S., Hammad, H.M., Nasim, W., **2021**. The Effect of Biochar and Nitrogen Inhibitor on Ammonia and Nitrous Oxide Emissions and Wheat Productivity. *Journal of Plant Growth Regulation.* https://doi.org/10.1007/s00344-020-10283-1

de Oliveira Silva, A., Ciampitti, I.A., Slafer, G.A., Lollato, R.P., **2020**. Nitrogen utilization efficiency in wheat: A global perspective. *European Journal of Agronomy* 114, 126008. https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126008

De Santis, M.A., Giuliani, M.M., Flagella, Z., Reyneri, A., Blandino, M., **2020**. Impact of nitrogen fertilisation strategies on the protein content, gluten composition and rheological properties of wheat for biscuit production. *Field Crops Research* 107829. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2020.107829

Del Coco, L., Laddomada, B., Migoni, D., Mita, G., Simeone, R., Fanizzi, F.P., **2019**. Variability and Site Dependence of Grain Mineral Contents in Tetraploid Wheats. *Sustainability* 11, 736. https://doi.org/10.3390/su11030736

Dellagi, A., Quillere, I., Hirel, B., **2020**. Beneficial soil-borne bacteria and fungi: a promising way to improve plant nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany*. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa112

Delwiche, S.R., **1998**. Protein Content of Single Kernels of Wheat by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Cereal Science* 27, 241–254. https://doi.org/10.1006/jcrs.1997.0165

Dhaka, V., Khatkar, B.S., **2015**. Effects of Gliadin/Glutenin and HMW-GS/LMW-GS Ratio on Dough Rheological Properties and Bread-Making Potential of Wheat Varieties. *Journal of Food Quality* 38, 71–82. https://doi.org/10.1111/jfq.12122

Di Mola, I., Cozzolino, E., Ottaiano, L., Nocerino, S., Rouphael, Y., Colla, G., El-Nakhel, C., Mori, M., **2020**. Nitrogen Use and Uptake Efficiency and Crop Performance of Baby Spinach (*Spinacia oleracea* L.) and Lamb's Lettuce (*Valerianella locusta* L.) Grown under Variable Sub-Optimal N Regimes Combined with Plant-Based Biostimulant Application. *Agronomy* 10, 278. https://doi.org/10.3390/agronomy10020278

Di Mola, I., Ottaiano, L., Cozzolino, E., Senatore, M., Giordano, M., El-Nakhel, C., Sacco, A., Rouphael, Y., Colla, G., Mori, M., **2019**. Plant-Based Biostimulants Influence the Agronomical, Physiological, and Qualitative Responses of Baby Rocket Leaves under Diverse Nitrogen Conditions. *Plants* 8, 522. https://doi.org/10.3390/plants8110522

Dil, M., Oelbermann, M., Xue, W., **2014**. An evaluation of biochar pre-conditioned with urea ammonium nitrate on maize (*Zea mays* L.) production and soil biochemical characteristics. *Canadian Journal of Soil Science*. https://doi.org/10.4141/cjss-2014-010

Ding, G., Che, P., Ilarslan, H., Wurtele, E.S., Nikolau, B.J., **2012**. Genetic dissection of methylcrotonyl CoA carboxylase indicates a complex role for mitochondrial leucine catabolism during seed development and germination. *The Plant Journal* 70, 562–577. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04893.x

Distelfeld, A., Avni, R., Fischer, A.M., **2014**. Senescence, nutrient remobilization, and yield in wheat and barley. *Journal of Experimental Botany* 65, 3783–3798. https://doi.org/10.1093/jxb/ert477

Dixon, N.E., Gazzola, C., Blakeley, R.L., Zerner, B., **1975**. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. *Journal of the American Chemical Society* 97, 4131–4133. https://doi.org/10.1021/ja00847a045

Doddema, H., Telkamp, G.P., **1979**. Uptake of Nitrate by Mutants of *Arabidopsis thaliana*, Disturbed in Uptake or Reduction of Nitrate. II. Kinetics. *Physiologia Plantarum* 45, 332–338. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1979.tb02593.x

Don, C., Mann, G., Bekes, F., Hamer, R.J., **2006**. HMW-GS affect the properties of glutenin particles in GMP and thus flour quality. *Journal of Cereal Science* 44, 127–136. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.02.005

D'Ovidio, R., Masci, S., **2004**. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *Journal of Cereal Science* 39, 321–339. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.12.002

Drechsler, N., Zheng, Y., Bohner, A., Nobmann, B., von Wirén, N., Kunze, R., Rausch, C., **2015**. Nitrate-Dependent Control of Shoot K Homeostasis by the Nitrate Transporter1/Peptide Transporter Family Member NPF7.3/NRT1.5 and the Stelar K+ Outward Rectifier SKOR in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 169, 2832–2847. https://doi.org/10.1104/pp.15.01152

du Jardin, P., **2015**. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, Biostimulants in Horticulture 196, 3–14. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021

Duan, F., Giehl, R.F.H., Geldner, N., Salt, D.E., von Wirén, N., **2018**. Root zone–specific localization of AMTs determines ammonium transport pathways and nitrogen allocation to shoots. *PLOS Biology* 16, e2006024. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006024

Duan, J., Tian, H., Drijber, R.A., Gao, Y., **2015**. Systemic and local regulation of phosphate and nitrogen transporter genes by arbuscular mycorrhizal fungi in roots of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 96, 199–208. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.08.006

Dubcovsky, J., Dvorak, J., **2007**. Genome Plasticity a Key Factor in the Success of Polyploid Wheat Under Domestication. *Science* 316, 1862–1866. https://doi.org/10.1126/science.1143986

Dumont, S., Bykova, N.V., Pelletier, G., Dorion, S., Rivoal, J., **2016**. Cytosolic Triosephosphate Isomerase from *Arabidopsis thaliana* Is Reversibly Modified by Glutathione on Cysteines 127 and 218. *Frontiers in Plant Science* 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01942

Dupont, F.M., Altenbach, S.B., **2003**. Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science* 38, 133–146. https://doi.org/10.1016/S0733-5210(03)00030-4

Dupont, F.M., Hurkman, W.J., Vensel, W.H., Tanaka, C., Kothari, K.M., Chung, O.K., Altenbach, S.B., **2006**. Protein accumulation and composition in wheat grains: Effects of mineral nutrients and high temperature. *European Journal of Agronomy* 25, 96–107. https://doi.org/10.1016/j.eja.2006.04.003

Dynowski, M., Mayer, M., Moran, O., Ludewig, U., **2008**. Molecular determinants of ammonia and urea conductance in plant aquaporin homologs. *FEBS Letters* 582, 2458–2462. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.06.012

Dziugieł, T., Wadas, W., **2020**. Effect of Plant Biostimulants on Macronutrient Content in Early Crop Potato Tubers. *Agronomy* 10, 1202. https://doi.org/10.3390/agronomy10081202

E

Ecarnot, M., Compan, F., Roumet, P., **2013**. Assessing leaf nitrogen content and leaf mass per unit area of wheat in the field throughout plant cycle with a portable spectrometer. *Field Crops Research* 140, 44–50. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.10.013

Ekanayake, G., LaMontagne, E.D., Heese, A., **2019**. Never Walk Alone: Clathrin-Coated Vesicle (CCV) Components in Plant Immunity. *Annual Review of Phytopathology* 57, 387–409. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045841

Elhaissoufi, W., Khourchi, S., Ibnyasser, A., Ghoulam, C., Rchiad, Z., Zeroual, Y., Lyamlouli, K., Bargaz, A., **2020**. Phosphate Solubilizing Rhizobacteria Could Have a Stronger Influence on Wheat Root Traits and Aboveground Physiology Than Rhizosphere P Solubilization. *Frontiers in Plant Science* 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00979

Emmerling, C., Krein, A., Junk, J., **2020**. Meta-Analysis of Strategies to Reduce NH_3 Emissions from Slurries in European Agriculture and Consequences for Greenhouse Gas Emissions. *Agronomy* 10, 1633. https://doi.org/10.3390/agronomy10111633

Engineer, C.B., Kranz, R.G., **2006**. Reciprocal Leaf and Root Expression of AtAmt1.1 and Root Architectural Changes in Response to Nitrogen Starvation. *Plant Physiology* 143, 236–250. https://doi.org/10.1104/pp.106.088500

Erisman, J.W., Sutton, M.A., Galloway, J., Klimont, Z., Winiwarter, W., **2008**. How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience* 1, 636–639. https://doi.org/10.1038/ngeo325

Ertani, A., Schiavon, M., Trentin, A., Malagoli, M., Nardi, S., **2015**. Effect of an *Alfalfa* Plant-Derived Biostimulant on Sulfur Nutrition in Tomato Plants, *Molecular Physiology and Ecophysiology of Sulfur*, Proceedings of the International Plant Sulfur Workshop. Springer International Publishing, Cham, pp. 215–220. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20137-5_23

Evens, N.P., Buchner, P., Williams, L.E., Hawkesford, M.J., **2017**. The role of ZIP transporters and group F bZIP transcription factors in the Zn-deficiency response of wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Journal* 92, 291–304. https://doi.org/10.1111/tpj.13655

Evers, T., Millar, S., **2002**. Cereal Grain Structure and Development: Some Implications for Quality. *Journal of Cereal Science* 36, 261–284. https://doi.org/10.1006/jcrs.2002.0435

F

Faccio, G., Flander, L., Buchert, J., Saloheimo, M., Nordlund, E., **2012**. Sulfhydryl oxidase enhances the effects of ascorbic acid in wheat dough. *Journal of Cereal Science* 55, 37–43. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.10.002

Feillet, P., **2000**. Le grain de blé : composition et utilisation. *Inra-Quae*. ISBN 2-7380-0896-8

Feng, G.H., Richardson, M., Chen, M.S., Kramer, K.J., Morgan, T.D., Reeck, G.R., **1996**. alpha-Amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human alpha-amylases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26, 419–426. https://doi.org/10.1016/0965-1748(95)00087-9

Ferrio, J.P., Bertran, E., Nachit, M.M., Català, J., Araus, J.L., **2004**. Estimation of grain yield by near-infrared reflectance spectroscopy in durum wheat. *Euphytica* 137, 373–380. https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000040523.52707.1e

Ficco, D.B.M., Riefolo, C., Nicastro, G., De Simone, V., Di Gesù, A.M., Beleggia, R., Platani, C., Cattivelli, L., De Vita, P., **2009**. Phytate and mineral elements concentration in a collection of Italian durum wheat cultivars. *Field Crops Research* 111, 235–242. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.12.010

Filipini, L.D., Pilatti, F.K., Meyer, E., Ventura, B.S., Lourenzi, C.R., Lovato, P.E., **2020**. Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. *Archives of microbiology*. https://doi.org/10.1007/s00203-020-02092-7

Filleur, S., Dorbe, M.-F., Cerezo, M., Orsel, M., Granier, F., Gojon, A., Daniel-Vedele, F., **2001**. An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Letters* 489, 220–224. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02096-8

Fiorentino, N., Ventorino, V., Woo, S.L., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., Romano, I., Lombardi, N., Napolitano, M., Colla, G., Rouphael, Y., **2018**. *Trichoderma*-Based Biostimulants Modulate Rhizosphere Microbial Populations and Improve N Uptake Efficiency, Yield, and Nutritional Quality of Leafy Vegetables. *Frontiers in Plant Science* 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00743

Fiorini, A., Maris, S.C., Abalos, D., Amaducci, S., Tabaglio, V., **2020**. Combining no-till with rye (*Secale cereale* L.) cover crop mitigates nitrous oxide emissions without decreasing yield. *Soil and Tillage Research* 196, 104442. https://doi.org/10.1016/j.still.2019.104442

Fischer, R., Kessler, B.M., **2015**. Gel-aided sample preparation (GASP) – a simplified method for gel-assisted proteomic sample generation from protein extracts and intact cells. *Proteomics* 15, 1224–1229. https://doi.org/10.1002/pmic.201400436

Fontaine, J., Schirmer, B., Hörr, J., **2002**. Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) Enables the Fast and Accurate Prediction of Essential Amino Acid Contents. 2. Results for Wheat, Barley, Corn, Triticale, Wheat Bran/Middlings, Rice Bran, and Sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3902–3911. https://doi.org/10.1021/jf011637k

Forrest, K.L., Bhave, M., **2007**. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Functional & Integrative Genomics* 7, 263–289. https://doi.org/10.1007/s10142-007-0049-4

Francesca, S., Arena, C., Hay Mele, B., Schettini, C., Ambrosino, P., Barone, A., Rigano, M.M., **2020**. The Use of a Plant-Based Biostimulant Improves Plant Performances and Fruit Quality in Tomato Plants Grown at Elevated Temperatures. *Agronomy* 10, 363. https://doi.org/10.3390/agronomy10030363

Fränken, J., Stephan, U., Meyer, H.E., König, W., **1994**. Identification of alpha-amylase inhibitor as a major allergen of wheat flour. *International Archives of Allergy and Immunology* 104, 171–174. https://doi.org/10.1159/000236726

Franzluebbers, A.J., **2007**. Integrated Crop–Livestock Systems in the Southeastern USA. *Agronomy Journal* 99, 361–372. https://doi.org/10.2134/agronj2006.0076

Frioni, T., VanderWeide, J., Palliotti, A., Tombesi, S., Poni, S., Sabbatini, P., **2021**. Foliar *vs.* soil application of *Ascophyllum nodosum* extracts to improve grapevine water stress tolerance. *Scientia Horticulturae* 277, 109807. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109807

Funck, D., Stadelhofer, B., Koch, W., **2008**. Ornithine-δ-aminotransferase is essential for Arginine Catabolism but not for Proline Biosynthesis. *BMC Plant Biology* 8, 40. https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-40

G

Gabriel, D., Pfitzner, C., Haase, N.U., Hüsken, A., Prüfer, H., Greef, J.-M., Rühl, G., 2017. New strategies for a reliable assessment of baking quality of wheat – Rethinking the current indicator protein content. *Journal of Cereal Science* 77, 126–134. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.08.002

Gaju, O., Allard, V., Martre, P., Le Gouis, J., Moreau, D., Bogard, M., Hubbart, S., Foulkes, M.J., **2014**. Nitrogen partitioning and remobilization in relation to leaf senescence, grain yield and grain nitrogen concentration in wheat cultivars. *Field Crops Research* 155, 213–223. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.09.003

Gaju, O., Allard, V., Martre, P., Snape, J.W., Heumez, E., LeGouis, J., Moreau, D., Bogard, M., Griffiths, S., Orford, S., Hubbart, S., Foulkes, M.J., **2011**. Identification of traits to improve the nitrogen-use efficiency of wheat genotypes. *Field Crops Research* 123, 139–152. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.05.010

Gaju, O., deSilva, J.G., Carvalho, P., Hawkesford, M.J., Griffiths, S., Greenland, A., Foulkes, M.J., **2016**. Leaf photosynthesis and associations with grain yield, biomass and nitrogen-use efficiency in landraces, synthetic-derived lines and cultivars in wheat. *Field Crops Research* 193, 1–15. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.04.018

Galambos, N., Compant, S., Moretto, M., Sicher, C., Puopolo, G., Wäckers, F., Sessitsch, A., Pertot, I., Perazzolli, M., **2020**. Humic Acid Enhances the Growth of Tomato Promoted by Endophytic Bacterial Strains Through the Activation of Hormone-, Growth-, and Transcription-Related Processes. *Frontiers in Plant Science* 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.582267

Galindo, F.S., Filho, M.C.M.T., Buzetti, S., Pagliari, P.H., Santini, J.M.K., **2020**. Can NBPT urease inhibitor in combination with *Azospirillum brasilense* inoculation improve wheat development? *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 117, 131–143. https://doi.org/10.1007/s10705-020-10061-1

Gansel, X., Muños, S., Tillard, P., Gojon, A., **2001**. Differential regulation of the NO_3^- and NH_4^+ transporter genes AtNrt2.1 and AtAmt1.1 in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N status of the plant: Differential regulation of AtNrt2.1 and AtAmt1.1. *The Plant Journal* 26, 143–155. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01016.x

Gao, X., Grant, C.A., **2012**. Cadmium and Zinc Concentration in Grain of Durum Wheat in Relation to Phosphorus Fertilization, Crop Sequence and Tillage Management. *Applied and Environmental Soil Science* 2012. https://doi.org/10.1155/2012/817107

García-Molina, M.D., García-Olmo, J., Barro, F., **2016**. Effective Identification of Low-Gliadin Wheat Lines by Near Infrared Spectroscopy (NIRS): Implications for the Development and Analysis of Foodstuffs Suitable for Celiac Patients. *PLOS ONE* 11, e0152292. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152292

Gargari, B.P., Mahboob, S., Razavieh, S.V., **2007**. Content of phytic acid and its mole ratio to zinc in flour and breads consumed in Tabriz, Iran. *Food Chemistry* 100, 1115–1119. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.018

Garnsworthy, P.C., Wiseman, J., Fegeros, K., **2000**. Prediction of chemical, nutritive and agronomic characteristics of wheat by near infrared spectroscopy. *The Journal of Agricultural Science* 135, 409–417. https://doi.org/10.1017/S0021859699008382

Gazzarrini, S., Lejay, L., Gojon, A., Ninnemann, O., Frommer, W.B., **1999**. Three Functional Transporters for Constitutive, Diurnally Regulated, and Starvation-Induced Uptake of Ammonium into Arabidopsis Roots. *Plant Cell* 11 (5) 937-947. https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.937

Gell, G., Kovács, K., Veres, G., Korponay-Szabó, I.R., Juhász, A., **2017**. Characterization of globulin storage proteins of a low prolamin cereal species in relation to celiac disease. *Scientific Reports* 7. https://doi.org/10.1038/srep39876

Genç, E., Atici, Ö., **2019**. Chicken feather protein hydrolysate as a biostimulant improves the growth of wheat seedlings by affecting biochemical and physiological parameters. *Turkish Journal of Botany* 43, 67–79.

Genschik, P., Jamet, E., Philipps, G., Parmentier, Y., Gigot, C., Fleck, J. **1994**. Molecular characterization of a beta-type proteasome subunit from *Arabidopsis thaliana* co-expressed at a high level with an alpha-type proteasome subunit early in the cell cycle. *Plant Journal* 6, 537–546. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1994.6040537.x

Gharibzahedi, S.M.T., Jafari, S.M., **2017**. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. *Trends in Food Science & Technology* 62, 119–132. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.017

Giehl, R.F.H., Laginha, A.M., Duan, F., Rentsch, D., Yuan, L., von Wirén, N., **2017**. A Critical Role of AMT2;1 in Root-To-Shoot Translocation of Ammonium in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 10, 1449–1460. https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.001

Gil-Ortiz, R., Naranjo, M.Á., Ruiz-Navarro, A., Atares, S., García, C., Zotarelli, L., San Bautista, A., Vicente, O., **2020a**. Enhanced Agronomic Efficiency Using a New Controlled-Released, Polymeric-Coated Nitrogen Fertilizer in Rice. *Plants* 9, 1183. https://doi.org/10.3390/plants9091183

Gil-Ortiz, R., Naranjo, M.Á., Ruiz-Navarro, A., Caballero-Molada, M., Atares, S., García, C., Vicente, O., ***2020b***. New Eco-Friendly Polymeric-Coated Urea Fertilizers Enhanced Crop Yield in Wheat. *Agronomy* 10, 438. https://doi.org/10.3390/agronomy10030438

Giovanini, M.P., Saltzmann, K.D., Puthoff, D.P., Gonzalo, M., Ohm, H.W., Williams, C.E., **2007**. A novel wheat gene encoding a putative chitin-binding lectin is associated with resistance

against Hessian fly. *Molecular Plant Pathology* 8, 69–82. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00371.x

Girin, T., Lejay, L., Wirth, J., Widiez, T., Palenchar, P.M., Nazoa, P., Touraine, B., Gojon, A., Lepetit, M., **2007**. Identification of a 150 bp *cis* -acting element of the *AtNRT2.1* promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status of the plant: Identification of *cis* -elements involved in the regulation of NO_3^- uptake. *Plant, Cell & Environment* 30, 1366–1380. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01712.x

Glass, A.D.M., **2009**. Nitrate uptake by plant roots. *Botany* 87, 659–667. https://doi.org/10.1139/B09-014

Glass, A.D.M., **2002**. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 855–864. https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.855

Glass, A.D.M., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J., Rufty, T.W., **1990**. Studies of the Uptake of Nitrate in Barley. *Plant Physiology* 93(4): 1426–1432.

Gojon, A., Krouk, G., Perrine-Walker, F., Laugier, E., **2011**. Nitrate transceptor(s) in plants. *Journal of Experimental Botany* 62, 2299–2308. https://doi.org/10.1093/jxb/erq419

Gojon, A., Nacry, P., Davidian, J.-C., **2009**. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 328–338. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.015

Gombert, J., **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. https://doi.org/10.1093/jxb/erj142

Gomez-Coronado, F., Poblaciones, M. j., Almeida, A. s., Cakmak, I., **2017**. Combined zinc and nitrogen fertilization in different bread wheat genotypes grown under mediterranean conditions. *Cereal Research Communications* 45, 154–165. https://doi.org/10.1556/0806.44.2016.046

Gooding, M.J., Davies, W.P., **1992**. Foliar urea fertilization of cereals: A review. *Fertilizer Research* 32, 209–222. https://doi.org/10.1007/BF01048783

Grant, C.A., **2014**. Use of NBPT and ammonium thiosulphate as urease inhibitors with varying surface placement of urea and urea ammonium nitrate in production of hard red spring wheat under reduced tillage management. *Canadian Journal of Plant Science*. https://doi.org/10.4141/cjps2013-289

Gray, C.W., Moot, D.J., McLaren, R.G., Reddecliffe, T., **2002**. Effect of nitrogen fertiliser applications on cadmium concentrations in durum wheat (*Triticum turgidum*) grain. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 30, 291–299. https://doi.org/10.1080/01140671.2002.9514226

Gready, J.E., Dwyer, S.A., Evans, J.R. **2013**. Applying photosynthesis research to improvement of food crops. *Australian Centre for International Agricultural Research*. Proceedings of a workshop held at the Australian National University, Canberra, Australian Capital Territory, Australia, 2-4 September 2009.

Gregersen, P.L., Holm, P.B., Krupinska, K., **2008**. Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology* 10, 37–49. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00114.x

Griffiths, M.W., Martin, A.D.E., Hocking, T.J., Reynolds, S.B., **1990**. Rapid analysis of sulphur in wheat grain by X-ray fluorescence spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 51, 27–33. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740510104

Guardia, G., Vallejo, A., Cardenas, L.M., Dixon, E.R., García-Marco, S., **2018**. Fate of ^{15}N-labelled ammonium nitrate with or without the new nitrification inhibitor DMPSA in an irrigated maize crop. *Soil Biology and Biochemistry* 116, 193–202. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.013

Guerrini, L., Napoli, M., Mancini, M., Masella, P., Cappelli, A., Parenti, A., Orlandini, S., **2020**. Wheat Grain Composition, Dough Rheology and Bread Quality as Affected by Nitrogen and Sulfur Fertilization and Seeding Density. *Agronomy* 10, 233. https://doi.org/10.3390/agronomy10020233

Gunes, A., Inal, A., Kadioglu, Y.K., **2009**. Determination of mineral element concentrations in wheat, sunflower, chickpea and lentil cultivars in response to P fertilization by polarized energy dispersive X-ray fluorescence. *X-Ray Spectrometry* 38, 451–462. https://doi.org/10.1002/xrs.1186

Gunupuru, L.R., Patel, J.S., Sumarah, M.W., Renaud, J.B., Mantin, E.G., Prithiviraj, B., **2019**. A plant biostimulant made from the marine brown algae *Ascophyllum nodosum* and chitosan reduce *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination in wheat. *PLOS ONE* 14, e0220562. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220562

Guo, F.-Q., Wang, R., Chen, M., Crawford, N.M., **2001**. The *Arabidopsis* Dual-Affinity Nitrate Transporter Gene AtNRT1.1 (CHL1) Is Activated and Functions in Nascent Organ Development during Vegetative and Reproductive Growth. *Plant Cell* 13(8): 1761–1778.

Guo, G., Lv, D., Yan, X., Subburaj, S., Ge, P., Li, X., Hu, Y., Yan, Y., **2012**. Proteome characterization of developing grains in bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology* 12, 147. https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-147

Guo, J., Bian, Y.-Y., Zhu, K.-X., Guo, X.-N., Peng, W., Zhou, H.-M., **2015**. Activation of Endogenous Phytase and Degradation of Phytate in Wheat Bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 1082–1087. https://doi.org/10.1021/jf504319t

Guo, T., Xuan, H., Yang, Y., Wang, L., Wei, L., Wang, Y., Kang, G., **2014**. Transcription Analysis of Genes Encoding the Wheat Root Transporter NRT1 and NRT2 Families During Nitrogen Starvation. *Journal of Plant Growth Regulation* 33, 837–848. https://doi.org/10.1007/s00344-014-9435-z

Guo, Y., Gan, S.-S., **2014**. Translational researches on leaf senescence for enhancing plant productivity and quality. *Journal of Experimental Botany* 65, 3901–3913. https://doi.org/10.1093/jxb/eru248

Gupta, P.K., Balyan, H.S., Sharma, S., Kumar, R., **2020**. Biofortification and bioavailability of Zn, Fe and Se in wheat: present status and future prospects. *Theoretical and Applied Genetics*. https://doi.org/10.1007/s00122-020-03709-7

Guttieri, M.J., Peterson, K.M., Souza, E.J., **2006**. Agronomic Performance of Low Phytic Acid Wheat. *Crop Science* 46, 2623–2629. https://doi.org/10.2135/cropsci2006.01.0008

Guttieri, M.J., Stein, R.J., Waters, B.M., **2013**. Nutrient partitioning and grain yield of TaNAM-RNAi wheat under abiotic stress. *Plant and Soil* 371, 573–591. https://doi.org/10.1007/s11104-013-1713-1

H

Habbib, H., Hirel, B., Verzeaux, J., Roger, D., Lacoux, J., Lea, P., Dubois, F., Tétu, T., **2017**. Investigating the Combined Effect of Tillage, Nitrogen Fertilization and Cover Crops on Nitrogen Use Efficiency in Winter Wheat. *Agronomy* 7, 66. https://doi.org/10.3390/agronomy7040066

Haddad, C., Arkoun, M., Jamois, F., Schwarzenberg, A., Yvin, J.-C., Etienne, P., Laîné, P., **2018**. Silicon Promotes Growth of *Brassica napus* L. and Delays Leaf Senescence Induced by Nitrogen Starvation. *Frontiers in Plant Science* 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00516

Haghighi, M., **2012**. The effect of humic and glutamic acids in nutrient solution on the N metabolism in lettuce. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 3023–3028. https://doi.org/10.1002/jsfa.5718

Haghighi, M., Saadat, S., Abbey, Lord, **2020**. Effect of exogenous amino acids application on growth and nutritional value of cabbage under drought stress. *Scientia Horticulturae* 272, 109561. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109561

Haghighi, M., Silva, J.A.T.D., **2013**. Amendment of hydroponic nutrient solution with humic acid and glutamic acid in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) culture. *Soil Science and Plant Nutrition* 59, 642–648. https://doi.org/10.1080/00380768.2013.809599

Hameed, Arruje, Farooq, T., Hameed, Amjad, Sheikh, M.A., **2021**. Silicon-Mediated Priming Induces Acclimation to Mild Water-Deficit Stress by Altering Physio-Biochemical Attributes in Wheat Plants. *Frontiers in Plant Science* 12. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.625541

Hassan, M.U., Islam, M.M., Wang, R., Guo, J., Luo, H., Chen, F., Li, X., **2020**. Glutamine application promotes nitrogen and biomass accumulation in the shoot of seedlings of the maize hybrid ZD958. *Planta* 251, 66. https://doi.org/10.1007/s00425-020-03363-9

Haug, W., Lantzsch, H.-J., **1983**. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34, 1423–1426. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740341217

Havé, M., Marmagne, A., Chardon, F., Masclaux-Daubresse, C., **2017**. Nitrogen remobilization during leaf senescence: lessons from *Arabidopsis* to crops. *Journal of Experimental Botany* 68, 2513–2529. https://doi.org/10.1093/jxb/erw365

Hawkesford, M.J., **2017**. Genetic variation in traits for nitrogen use efficiency in wheat. *Journal of Experimental Botany* 68, 2627–2632. https://doi.org/10.1093/jxb/erx079

Hawkesford, M.J., Araus, J.-L., Park, R., Calderini, D., Miralles, D., Shen, T., Zhang, J., Parry, M.A.J., **2013**. Prospects of doubling global wheat yields. *Food and Energy Security* 2, 34–48. https://doi.org/10.1002/fes3.15

Hawkesford, M.J., Buchner, P., Riche, A.B., **2018**. Nutrient Dynamics in Wheat. *Annual Plant Reviews Online.* American Cancer Society, pp. 1–14. https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0663

Hawkesford, M.J., Riche, A.B., **2020**. Impacts of G x E x M on Nitrogen Use Efficiency in Wheat and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science* 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01157

Hebbar, K.B., Rane, J., Ramana, S., Panwar, N.R., Ajay, S., Rao, A.S., Prasad, P.V.V., **2014**. Natural variation in the regulation of leaf senescence and relation to N and root traits in wheat. *Plant and Soil* 378, 99–112. https://doi.org/10.1007/s11104-013-2012-6

Hellequin, E., Monard, C., Chorin, M., Le Bris, N., Daburon, V., Klarzynski, O., Binet, F., **2020**. Responses of active soil microorganisms facing to a soil biostimulant input compared to plant legacy effects. *Scientific Reports* 10, 13727. https://doi.org/10.1038/s41598-020-70695-7

Hellequin, E., Monard, C., Quaiser, A., Henriot, M., Klarzynski, O., Binet, F., **2018**. Specific recruitment of soil bacteria and fungi decomposers following a biostimulant application increased crop residues mineralization. *PLOS ONE* 13, e0209089. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209089

Hénault, C., Bourennane, H., Ayzac, A., Ratié, C., Saby, N.P.A., Cohan, J.-P., Eglin, T., Gall, C.L., **2019**. Management of soil pH promotes nitrous oxide reduction and thus mitigates soil emissions of this greenhouse gas. *Scientific Reports* 9, 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56694-3

Henault, C., Devis, X., Page, S., Justes, E., Reau, R., Germon, J.C., **1998**. Nitrous oxide emissions under different soil and land management conditions. *Biology and Fertility of Soils* 26, 199–207. https://doi.org/10.1007/s003740050368

Herrero, M., Thornton, P.K., Notenbaert, A.M., Wood, S., Msangi, S., Freeman, H.A., Bossio, D., Dixon, J., Peters, M., Steeg, J. van de, Lynam, J., Rao, P.P., Macmillan, S., Gerard, B., McDermott, J., Seré, C., Rosegrant, M., **2010**. Smart Investments in Sustainable Food Production: Revisiting Mixed Crop-Livestock Systems. *Science* 327, 822–825. https://doi.org/10.1126/science.1183725

Hesse, H., Nikiforova, V., Gakière, B., Hoefgen, R., **2004**. Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany* 55, 1283–1292. https://doi.org/10.1093/jxb/erh136

Heuermann, D., Hahn, H., von Wirén, N., **2021**. Seed Yield and Nitrogen Efficiency in Oilseed Rape After Ammonium Nitrate or Urea Fertilization. *Frontiers in Plant Science* 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.608785

Heyneke, E., Watanabe, M., Erban, A., Duan, G., Buchner, P., Walther, D., Kopka, J., Hawkesford, M.J., Hoefgen, R., **2017**. Characterization of the Wheat Leaf Metabolome during Grain Filling and under Varied N-Supply. *Frontiers in Plant Science* 8, 2048. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02048

Hirel, B., Tétu, T., Lea, P.J., Dubois, F., **2011**. Improving Nitrogen Use Efficiency in Crops for Sustainable Agriculture. *Sustainability* 3, 1452–1485. https://doi.org/10.3390/su3091452

Hofman, G., Cleemput, O., **2004**. Soil and Plant Nitrogen. *International Fertilizer Industry Association*, 49.

Hollmann, J., Gregersen, P.L., Krupinska, K., **2014**. Identification of predominant genes involved in regulation and execution of senescence-associated nitrogen remobilization in flag leaves of field grown barley. *Journal of Experimental Botany* 65, 3963–3973. https://doi.org/10.1093/jxb/eru094

Honta, H., Inamura, T., Konishi, T., Satoh, S., Iwai, H., **2018**. UDP-arabinopyranose mutase gene expressions are required for the biosynthesis of the arabinose side chain of both pectin and arabinoxyloglucan, and normal leaf expansion in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Plant Research* 131, 307–317. https://doi.org/10.1007/s10265-017-0985-6

Hörtensteiner, S., Feller, U., **2002**. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* 53, 927–937. https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.927

Hoseinian, Y., Bahmanyar, M.A., Sadegh-zade, F., Emadi, M., Biparva, P., **2020**. Effects of different sources of silicon and irrigation regime on rice yield components and silicon dynamics in the plant and soil. *Journal of Plant Nutrition* 43, 2322-2335. https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1771577

Howitt, S.M., Udvardi, M.K., **2000**. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - *Biomembranes* 1465, 152–170. https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00136-X

Hoyle, A., Brennan, M., Jackson, G., Hoad, S., **2019**. Specific weight of barley grains is determined by traits affecting packing efficiency and by grain density. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99, 2548–2555. https://doi.org/10.1002/jsfa.9465

Hu, M., Zhao, X., Liu, Q., Hong, X., Zhang, W., Zhang, Y., Sun, L., Li, H., Tong, Y., **2018**. Transgenic expression of plastidic glutamine synthetase increases nitrogen uptake and yield in wheat. *Plant Biotechnology Journal* 16, 1858–1867. https://doi.org/10.1111/pbi.12921

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(8) 1381-1392 https://doi.org/10.1105/tpc.11.8.138113.

Huang, S., Millar, A.H., **2013**. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. *Current Opinion in Plant Biology, Physiology and metabolism* 16, 344–349. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.007

Huang, X., Duan, S., Wu, Q., Yu, M., Shabala, S., **2020**. Reducing Cadmium Accumulation in Plants: Structure–Function Relations and Tissue-Specific Operation of Transporters in the Spotlight. *Plants* 9, 223. https://doi.org/10.3390/plants9020223

Huf, M. ten, Olfs, H.-W., **2020**. Effect of the nitrification inhibitor DMPP on nitrous oxide emissions and the stabilization of ammonium following the injection of dairy slurry and digestate in a soil-column experiment. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 183(2), 129-135. https://doi.org/10.1002/jpln.201900025

Hurkman, W.J., DuPont, F.M., Altenbach, S.B., Combs, A., Chan, R., Tanaka, C.K., Reuveni, M., Bernardin, J.E., **1998**. BiP, HSP70, NDK and PDI in wheat endosperm. II. Effects of high temperature on protein and mRNA accumulation. *Physiologia Plantarum* 103, 80–90. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1030110.x

Hurkman, W.J., Tanaka, C.K., **2007**. Extraction of wheat endosperm proteins for proteome analysis. *Journal of Chromatography B, Analytical Tools for Proteomics* 849, 344–350. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.047

Hurrell, R., Egli, I., **2010**. Iron bioavailability and dietary reference values. *The American Journal of Clinical Nutrition* 91, 1461-1467. https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674F

Hussain, A., Ahmad, M., Mumtaz, M.Z., Ali, S., Sarfraz, R., Naveed, M., Jamil, M., Damalas, C.A., **2020a**. Integrated Application of Organic Amendments with Alcaligenes sp. AZ9 Improves Nutrient Uptake and Yield of Maize (*Zea mays*). *Journal of Plant Growth Regulation.* https://doi.org/10.1007/s00344-020-10067-7

Hussain, A., Ahmad, M., Nafees, M., Iqbal, Z., Luqman, M., Jamil, M., Maqsood, A., Mora-Poblete, F., Ahmar, S., Chen, J.-T., Alyemeni, M.N., Ahmad, P., **2020b**. Plant-growth-promoting *Bacillus* and *Paenibacillus* species improve the nutritional status of *Triticum aestivum* L. *PLOS ONE* 15, e0241130. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241130

Hussain, S., Maqsood, M.A., Rengel, Z., Aziz, T., **2012**. Biofortification and estimated human bioavailability of zinc in wheat grains as influenced by methods of zinc application. *Plant Soil* 361, 279–290. https://doi.org/10.1007/s11104-012-1217-4

I

Imran, M., Hu, C., Hussain, S., Rana, M.S., Riaz, M., Afzal, J., Aziz, O., Elyamine, A.M., Farag Ismael, M.A., Sun, X., **2019a**. Molybdenum-induced effects on photosynthetic efficacy of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under different nitrogen sources are associated with nitrogen assimilation. *Plant Physiology and Biochemistry* 141, 154–163. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.024

Imran, M., Sun, X., Hussain, S., Ali, U., Rana, M.S., Rasul, F., Saleem, M.H., Moussa, M.G., Bhantana, P., Afzal, J., Elyamine, A.M., Hu, C.X., **2019b**. Molybdenum-Induced Effects on Nitrogen Metabolism Enzymes and Elemental Profile of Winter Wheat (*Triticum aestivum*

L.) Under Different Nitrogen Sources. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 3009. https://doi.org/10.3390/ijms20123009

Ingraffia, R., Amato, G., Sosa-Hernández, M.A., Frenda, A.S., Rillig, M.C., Giambalvo, D., **2020**. Nitrogen Type and Availability Drive Mycorrhizal Effects on Wheat Performance, Nitrogen Uptake and Recovery, and Production Sustainability. *Frontiers in Plant Science* 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00760

Iñigo, S., Giraldez, A.N., Chory, J., Cerdán, P.D., **2012**. Proteasome-mediated turnover of *Arabidopsis* MED25 is coupled to the activation of FLOWERING LOCUS T transcription. *Plant Physiology* 160, 1662–1673. https://doi.org/10.1104/pp.112.205500

Ishida, H., Yoshimoto, K., **2008**. Chloroplasts are partially mobilized to the vacuole by autophagy. *Autophagy* 4, 961–962. https://doi.org/10.4161/auto.6804

Ito, N., Tomizawa, K., Tanaka, K., Matsui, M., Kendrick, R.E., Sato, T., Nakagawa, H., **1997**. Characterization of 26S proteasome α- and β-type and ATPase subunits from spinach and their expression during early stages of seedling development. *Plant Molecular Biology* 34, 307–316. https://doi.org/10.1023/A:1005839501822

J

Jardin, P. du, Xu, L., Geelen, D., **2020**. Agricultural Functions and Action Mechanisms of Plant Biostimulants (PBs), in: *The Chemical Biology of Plant Biostimulants*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–30. https://doi.org/10.1002/9781119357254.ch1

Järup L, Berglund, M., Elinder, C.G., Nordberg, G., Vahter, M., **1998**. Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 24, 1–51.

Jeong, H.-J., Shin, J.S., Ok, S.H., **2011**. Barley DNA-binding methionine aminopeptidase, which changes the localization from the nucleus to the cytoplasm by low temperature, is involved in freezing tolerance. *Plant Science, Plant and Microbe Adaptation to Cold* 180, 53–60. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.09.004

Jez, J.M., **2019**. Structural biology of plant sulfur metabolism: from sulfate to glutathione. *Journal of Experimental Botany* 70, 4089–4103. https://doi.org/10.1093/jxb/erz094

Ji, C., Liu, Z., Hao, L., Song, X., Wang, C., Liu, Y., Li, H., Li, C., Gao, Q., Liu, X., **2020**. Effects of *Enterobacter cloacae* HG-1 on the Nitrogen-Fixing Community Structure of Wheat Rhizosphere Soil and on Salt Tolerance. *Frontiers in Plant Science* 11, 1094. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01094

Jia, Y., Zou, D., Wang, J., Sha, H., Liu, H., Inayat, M.A., Sun, J., Zheng, H., Xia, N., Zhao, H., **2017**. Effects of γ-Aminobutyric Acid, Glutamic Acid, and Calcium Chloride on Rice (*Oryza sativa* L.) Under Cold Stress During the Early Vegetative Stage. *Journal of Plant Growth Regulation* 36, 240–253. https://doi.org/10.1007/s00344-016-9634-x

Jiang, S., Sun, J., Tian, Z., Hu, H., Michel, E.J.S., Gao, J., Jiang, D., Cao, W., Dai, T., **2017**. Root extension and nitrate transporter up-regulation induced by nitrogen deficiency improves nitrogen status and plant growth at the seedling stage of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental and Experimental Botany* 141, 28–40. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.06.006

Jibran, R., Hunter, D., Dijkwel, P., **2013**. Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. *Plant Molecular Biology* 82, 547–561. https://doi.org/10.1007/s11103-013-0043-2

Jirsa, O., Hrušková, M., Švec, I., **2008**. Near-infrared prediction of milling and baking parameters of wheat varieties. *Journal of Food Engineering*, CHISA 2006 Special Section (pp. 1-63) 87, 21–25. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.09.008

Johansson, E., Malik, A.H., Hussain, A., Rasheed, F., Newson, W.R., Plivelic, T., Hedenqvist, M.S., Gällstedt, M., Kuktaite, R., **2013**. Wheat Gluten Polymer Structures: The Impact of Genotype, Environment, and Processing on Their Functionality in Various Applications. *Cereal Chemistry Journal* 90, 367–376. https://doi.org/10.1094/CCHEM-08-12-0105-FI

Justes, E., Mary, B., Meynard, J.-M., Machet, J.-M., Thelier-Huche, L., **1994**. Determination of a Critical Nitrogen Dilution Curve for Winter Wheat Crops. *Annals of Botany* 74, 397–407. https://doi.org/10.1006/anbo.1994.1133

Justes, E., Meynard, J.M., Mary, B., Plénet, D., **1997**. Diagnosis Using Stem Base Extract: JUBIL Method, in: Lemaire, G. (Ed.), *Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 163–187. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60684-7_10

K

Kabir, A.H., Debnath, T., Das, U., Prity, S.A., Haque, A., Rahman, M.M., Parvez, M.S., **2020**. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate Fe-deficiency symptoms in sunflower by increasing iron uptake and its availability along with antioxidant defense. *Plant Physiology and Biochemistry* 150, 254–262. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.010

Kaczmarek, M., Fedorowicz-Strońska, O., Głowacka, K., Waśkiewicz, A., Sadowski, J., **2016**. $CaCl_2$ treatment improves drought stress tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). Acta Physiol Plant 39, 41. https://doi.org/10.1007/s11738-016-2336-y

Kaiser, B.N., **2002**. Functional Analysis of an *Arabidopsis* T-DNA "Knockout" of the High-Affinity NH_4^+ Transporter AtAMT1;1. *Plant Physiology* 130, 1263–1275. https://doi.org/10.1104/pp.102.010843

Kalcsits, L.A., **2016**. Non-destructive Measurement of Calcium and Potassium in Apple and Pear Using Handheld X-ray Fluorescence. *Frontiers in Plant Science* 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00442

Kant, S., Burch, D., Badenhorst, P., Palanisamy, R., Mason, J., Spangenberg, G., **2015**. Regulated Expression of a Cytokinin Biosynthesis Gene IPT Delays Leaf Senescence and Improves Yield under Rainfed and Irrigated Conditions in Canola (*Brassica napus* L.). *PLOS ONE* 10, e0116349. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116349

Karimzadeh, J., Alikhani, H.A., Etesami, H., Pourbabaei, A.A., **2020**. Improved Phosphorus Uptake by Wheat Plant (*Triticum aestivum* L.) with Rhizosphere *Fluorescent Pseudomonas* Strains Under Water-Deficit Stress. *Journal of Plant Growth Regulation.* https://doi.org/10.1007/s00344-020-10087-3

Khan, M., Rozhon, W., Poppenberger, B., **2014**. The Role of Hormones in the Aging of Plants - A Mini-Review. *Gerontology* 60, 49–55. https://doi.org/10.1159/000354334

Khan, S., Yu, H., Li, Q., Gao, Y., Sallam, B.N., Wang, H., Liu, P., Jiang, W., **2019**. Exogenous Application of Amino Acids Improves the Growth and Yield of Lettuce by Enhancing Photosynthetic Assimilation and Nutrient Availability. *Agronomy* 9, 266. https://doi.org/10.3390/agronomy9050266

Khokhar, J.S., Sareen, S., Tyagi, B.S., Singh, G., Wilson, L., King, I.P., Young, S.D., Broadley, M.R., **2018**. Variation in grain Zn concentration, and the grain ionome, in field-grown Indian wheat. *PLOS ONE* 13, e0192026. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192026

Kichey, T., Hirel, B., Heumez, E., Dubois, F., Le Gouis, J., **2007**. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Research* 102, 22–32. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2007.01.002

Kichey, T., Le Gouis, J., Sangwan, B., Hirel, B., Dubois, F., **2005**. Changes in the Cellular and Subcellular Localization of Glutamine Synthetase and Glutamate Dehydrogenase During Flag Leaf Senescence in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Cell Physiology* 46, 964–974. https://doi.org/10.1093/pcp/pci105

Kim, W.T., Franceschi, V.R., Krishnan, H.B., Okita, T.W., **1988**. Formation of wheat protein bodies: Involvement of the Golgi apparatus in gliadin transport. *Planta* 176, 173–182. https://doi.org/10.1007/BF00392442

Klepper, B., Rickman, R.W., Peterson, C.M., **1982**. Quantitative Characterization of Vegetative Development in Small Cereal Grains1. *Agronomy Journal* 74, 789. https://doi.org/10.2134/agronj1982.00021962007400050005x

Kobayashi, T., Nozoye, T., Nishizawa, N.K., **2019**. Iron transport and its regulation in plants. Free Radical Biology and Medicine, Iron as Soul of Life on Earth Revisited: From *Chemical Reaction, Ferroptosis to Therapeutics* 133, 11–20. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439

Kohl, S., Hollmann, J., Erban, A., Kopka, J., Riewe, D., Weschke, W., Weber, H., **2015**. Metabolic and transcriptional transitions in barley glumes reveal a role as transitory resource buffers during endosperm filling. *Journal of Experimental Botany* 66, 1397–1411. https://doi.org/10.1093/jxb/eru492

Kojima, S., Bohner, A., Gassert, B., Yuan, L., Wirén, N. von, **2007**. AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots: High-affinity urea uptake in plants. *The Plant Journal* 52, 30–40. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03223.x

Kong, L., Xie, Y., Hu, L., Feng, B., Li, S., **2016**. Remobilization of vegetative nitrogen to developing grain in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research* 196, 134–144. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.06.015

Kowalska, J., Tyburski, J., Kowalska, J., Krzymińska, J., **2020**. Effect of Different Forms of Silicon on Growth of Spring Wheat Cultivated in Organic Farming System. *Silicon*. https://doi.org/10.1007/s12633-020-00414-4

Krapp, A., Saliba-Colombani, V., Daniel-Vedele, F., **2005**. Analysis of C and N metabolisms and of C/N interactions using quantitative genetics. *Photosynthesis Research* 83, 251–263. https://doi.org/10.1007/s11120-004-3196-7

Krochmal-Marczak, B., Sawicka, B., **2008**. Relationship between physical and chemical properties of soil and iron, manganese and zinc content in a grain of winter wheat. *Polish Journal of Environmental Studies* 17, 278–283.

Krogmeier, M.J., McCarty, G.W., Bremner, J.M., **1989**. Potential phytotoxicity associated with the use of soil urease inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 1110–1112. https://doi.org/10.1073/pnas.86.4.1110

Krol, D.J., Forrestal, P.J., Wall, D., Lanigan, G.J., Sanz-Gomez, J., Richards, K.G., **2020**. Nitrogen fertilisers with urease inhibitors reduce nitrous oxide and ammonia losses, while retaining yield in temperate grassland. *Science of The Total Environment* 725, 138329. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138329

Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Class, A.D.M., **1996**. Kinetics of NH_4^+ Influx in Spruce. *Plant Physiology* 110(3): 773–779.

Krouk, G., **2006**. Regulation of the High-Affinity NO_3^- Uptake System by NRT1.1-Mediated NO_3^- Demand Signaling in *Arabidopsis. Plant Physiology* 142(3) 1075-1086. https//doi.org/10.1104/pp.106.087510

Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., Zazimalova, E., Benkova, E., Nacry, P., Gojon, A., **2010**. Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell* 18, 927–937. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.008

Kumar Sootahar, M., Zeng, X., Wang, Y., Su, S., Soothar, P., Bai, L., Kumar, M., Zhang, Y., Mustafa, A., Ye, N., **2020**. The Short-Term Effects of Mineral- and Plant-Derived Fulvic Acids on Some Selected Soil Properties: Improvement in the Growth, Yield, and Mineral Nutritional Status of Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Soils of Contrasting Textures. *Plants* 9, 205. https://doi.org/10.3390/plants9020205

Kusaba, M., Tanaka, A., Tanaka, R., **2013**. Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. *Photosynthesis Research* 117, 221–234. https://doi.org/10.1007/s11120-013-9862-x

Kutman, U.B., Yildiz, B., Ozturk, L., Cakmak, I., **2010**. Biofortification of Durum Wheat with Zinc Through Soil and Foliar Applications of Nitrogen. *Cereal Chemistry* 87, 1–9. https://doi.org/10.1094/CCHEM-87-1-0001

Kwon, C.-T., Paek, N.-C., **2016**. Gibberellic Acid: A Key Phytohormone for Spikelet Fertility in Rice Grain Production. *International Journal of Molecular Sciences* 17. https://doi.org/10.3390/ijms17050794

L

Laîné, P., Haddad, C., Arkoun, M., Yvin, J.-C., Etienne, P., **2019**. Silicon Promotes Agronomic Performance in *Brassica napus* Cultivated under Field Conditions with Two Nitrogen Fertilizer Inputs. *Plants* 8, 137. https://doi.org/10.3390/plants8050137

Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabijns, A., Van den Ende, W., **2009**. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *Journal of Experimental Botany* 60, 727–740. https://doi.org/10.1093/jxb/ern333

Lamont, J.R., Wilkins, O., Bywater-Ekegärd, M., Smith, D.L., **2017**. From yogurt to yield: Potential applications of lactic acid bacteria in plant production. *Soil Biology and Biochemistry* 111, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.03.015

Lancashire, P.D., Bleiholder, H., Boom, T.V.D., Langelüddeke, P., Stauss, R., Weber, E., Witzenberger, A., **1991**. A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals of Applied Biology* 119, 561–601. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1991.tb04895.x

Laperche, A., Devienne-Barret, F., Maury, O., Le Gouis, J., Ney, B., **2006**. A simplified conceptual model of carbon/nitrogen functioning for QTL analysis of winter wheat adaptation to nitrogen deficiency. *Theoretical and Applied Genetics* 113, 1131–1146. https://doi.org/10.1007/s00122-006-0373-4

Lassaletta, L., Billen, G., Garnier, J., Oita, A., Shibata, H., Shindo, J., Hayashi, K., **2019**. Nitrogen Embedded in Global Food Trade, in: Ferranti, P., Berry, E.M., Anderson, J.R. (Eds.), *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*. Elsevier, Oxford, pp. 105–109. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21975-6

Lassaletta, L., Billen, G., Grizzetti, B., Anglade, J., Garnier, J., **2014**. 50 years trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: the relationship between yield and nitrogen input to cropland. *Environmental Research Letters* 9, 105011. https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/10/105011

Lastochkina, O., Garshina, D., Allagulova, C., Fedorova, K., Koryakov, I., Vladimirova, A., **2020**. Application of Endophytic *Bacillus subtilis* and Salicylic Acid to Improve Wheat Growth and Tolerance under Combined Drought and *Fusarium* Root Rot Stresses. *Agronomy* 10, 1343. https://doi.org/10.3390/agronomy10091343

Laurent, E.-A., Ahmed, N., Durieu, C., Grieu, P., Lamaze, T., **2020**. Marine and fungal biostimulants improve grain yield, nitrogen absorption and allocation in durum wheat plants. *The Journal of Agricultural Science* 158, 279–287. https://doi.org/10.1017/S0021859620000660

Lawrencia, D., Wong, S.K., Low, D.Y.S., Goh, B.H., Goh, J.K., Ruktanonchai, U.R., Soottitantawat, A., Lee, L.H., Tang, S.Y., **2021**. Controlled Release Fertilizers: A Review on Coating Materials and Mechanism of Release. *Plants* 10, 238. https://doi.org/10.3390/plants10020238

Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F.D., Filleur, S., Daniel-Vedele, F., Gojon, A., **1999**. Molecular and functional regulation of two NO_3^- uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal* 18, 509–519. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00480.x

Lemaitre, T., Hodges, M., **2006**. Expression Analysis of *Arabidopsis thaliana* NAD-dependent Isocitrate Dehydrogenase Genes Shows the Presence of a Functional Subunit That Is Mainly Expressed in the Pollen and Absent from Vegetative Organs. *Plant and Cell Physiology* 47, 634–643. https://doi.org/10.1093/pcp/pcj030

Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., Moënne-Loccoz, Y., **2017**. Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends Plant Science* 22, 583–595. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.008

Lescano, I., Bogino, M.F., Martini, C., Tessi, T.M., González, C.A., Schumacher, K., Desimone, M., **2020**. Ureide Permease 5 (AtUPS5) Connects Cell Compartments Involved in Ureide Metabolism. *Plant Physiology* 182, 1310–1325. https://doi.org/10.1104/pp.19.01136

Li, C., Tang, Z., Wei, J., Qu, H., Xie, Y., Xu, G., **2016**. The OsAMT1.1 gene functions in ammonium uptake and ammonium–potassium homeostasis over low and high ammonium concentration ranges. *Journal of Genetics and Genomics* 43, 639–649. https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.11.001

Li, J.-Y., Fu, Y.-L., Pike, S.M., Bao, J., Tian, W., Zhang, Y., Chen, C.-Z., Zhang, Y., Li, H.-M., Huang, J., Li, L.-G., Schroeder, J.I., Gassmann, W., Gong, J.-M., **2010**. The *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT1.8 Functions in Nitrate Removal from the Xylem Sap and Mediates Cadmium Tolerance. *The Plant Cell Online* 22, 1633–1646. https://doi.org/10.1105/tpc.110.075242

Li, M., Yue, Q., Liu, C., Zheng, X., Hong, J., Li, L., Bian, K., **2020**. Effect of gliadin/glutenin ratio on pasting, thermal, and structural properties of wheat starch. *Journal of Cereal Science* 102973. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.102973

Li, Q., Yang, A., Wang, Z., Roelcke, M., Chen, X., Zhang, F., Pasda, G., Zerulla, W., Wissemeier, A.H., Liu, X., **2015**. Effect of a new urease inhibitor on ammonia volatilization and nitrogen utilization in wheat in north and northwest China. *Field Crops Research* 175, 96–105. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.02.005

Li, T., Liao, K., Xu, X., Gao, Y., Wang, Z., Zhu, X., Jia, B., Xuan, Y., **2017**. Wheat Ammonium Transporter (AMT) Gene Family: Diversity and Possible Role in Host–Pathogen Interaction with Stem Rust. *Frontiers in Plant Science* 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01637

Liang, H., Shen, P., Kong, X., Liao, Y., Liu, Y., Wen, X., **2020**. Optimal Nitrogen Practice in Winter Wheat-Summer Maize Rotation Affecting the Fates of ^{15}N-Labeled Fertilizer. *Agronomy* 10, 521. https://doi.org/10.3390/agronomy10040521

Liao, J., Liu, X., Hu, A., Song, H., Chen, X., Zhang, Z., **2020**. Effects of biochar-based controlled release nitrogen fertilizer on nitrogen-use efficiency of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Scientific Reports* 10, 11063. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67528-y

Likar, M., Vogel-Mikuš, K., Potisek, M., Hančević, K., Radić, T., Nečemer, M., Regvar, M., **2015**. Importance of soil and vineyard management in the determination of grapevine mineral composition. *Science of The Total Environment* 505, 724–731. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.057

Lillo, C., **2008**. Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *Biochemical Journal* 415, 11–19. https://doi.org/10.1042/BJ20081115

Lim, P.O., Kim, H.J., Nam, H.G., **2007**. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* 58, 115–136. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105316

Lin, S.-H., Kuo, H.-F., Canivenc, G., Lin, C.-S., Lepetit, M., Hsu, P.-K., Tillard, P., Lin, H.-L., Wang, Y.-Y., Tsai, C.-B., Gojon, A., Tsay, Y.-F., **2008**. Mutation of the *Arabidopsis* NRT1.5 Nitrate Transporter Causes Defective Root-to-Shoot Nitrate Transport. *The Plant Cell Online* 20, 2514–2528. https://doi.org/10.1105/tpc.108.060244

Liu, B., Li, P., Li, X., Liu, C., Cao, S., Chu, C., Cao, X., **2005**. Loss of function of OsDCL1 affects microRNA accumulation and causes developmental defects in rice. *Plant Physiology* 139, 296–305. https://doi.org/10.1104/pp.105.063420

Liu, C., Wang, K., Zheng, X., **2013**. Effects of nitrification inhibitors (DCD and DMPP) on nitrous oxide emission, crop yield and nitrogen uptake in a wheat–maize cropping system. *Biogeosciences* 10, 2427–2437. https://doi.org/10.5194/bg-10-2427-2013

Liu, K., Diener, A., Lin, Z., Liu, C., Sheen, J., **2020**. Primary nitrate responses via calcium signalling and diverse protein phosphorylation. *Journal of Experimental Botany*. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa047

Liu, K.-H., Tsay, Y.-F., **2003**. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO Journal* 22, 1005–1013. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg118

Liu, L.-H., **2003**. AtDUR3 Encodes a New Type of High-Affinity Urea/H^+ Symporter in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 15, 790–800. https://doi.org/10.1105/tpc.007120

Liu, S., Wang, X., Yin, X., Savoy, H.J., McClure, A., Essington, M.E., **2019**. Ammonia Volatilization Loss and Corn Nitrogen Nutrition and Productivity with Efficiency Enhanced UAN and Urea under No-tillage. *Scientific Reports* 9, 6610. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42912-5

Liu, Yanyan, Cao, Y., Zhang, Q., Li, X., Wang, S., **2018**. A Cytosolic Triosephosphate Isomerase Is a Key Component in XA3/XA26-Mediated Resistance. *Plant Physiology* 178, 923–935. https://doi.org/10.1104/pp.18.00348

Liu, Yan, Li, L., Zhang, L., Lv, Q., Zhao, Y., Li, X., **2018**. Isolation and identification of wheat gene TaDIS1 encoding a RING finger domain protein, which negatively regulates drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Science* 275, 49–59. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.07.017

Livramento, K.G. do, Borém, F.M., José, A.C., Santos, A.V., Livramento, D.E. do, Alves, J.D., Paiva, L.V., **2017**. Proteomic analysis of coffee grains exposed to different drying process. *Food Chemistry* 221, 1874–1882. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.069

Lombardi, N., Caira, S., Troise, A.D., Scaloni, A., Vitaglione, P., Vinale, F., Marra, R., Salzano, A.M., Lorito, M., Woo, S.L., **2020**. *Trichoderma* Applications on Strawberry Plants Modulate the Physiological Processes Positively Affecting Fruit Production and Quality. *Frontiers in Microbiology* 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01364

Lopes, M.S., Cortadellas, N., Kichey, T., Dubois, F., Habash, D.Z., Araus, J.L., **2006**. Wheat nitrogen metabolism during grain filling: comparative role of glumes and the flag leaf. *Planta* 225, 165–181. https://doi.org/10.1007/s00425-006-0338-5

López-Lefebre, L.R., Ruiz, J.M., Rivero, R.M., Garía, P.C., Sánchez, E., Romero, L., **2000**. Role of $CaCl_2$ in Ammonium Assimilation in Roots of Tobacco Plants (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Plant Physiology* 156, 672–677. https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80230-8

Loqué, D., Yuan, L., Kojima, S., Gojon, A., Wirth, J., Gazzarrini, S., Ishiyama, K., Takahashi, H., von Wirén, N., **2006**. Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* 48, 522–534. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02887.x

Lu, C., Tian, H., **2017**. Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance. *Earth System Science Data* 9, 181–192. https://doi.org/10.5194/essd-9-181-2017

Luo, Y., Tang, Y., Zhang, X., Li, W., Chang, Y., Pang, D., Xu, X., Li, Y., Wang, Z., **2018**. Interactions between cytokinin and nitrogen contribute to grain mass in wheat cultivars by regulating the flag leaf senescence process. *The Crop Journal* 6, 538–551. https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.05.008

M

Ma, F., Li, M., Li, T., Liu, W., Liu, Y., Li, Y., Hu, W., Zheng, Q., Wang, Yaqiong, Li, K., Chang, J., Chen, M., Yang, G., Wang, Yuesheng, He, G., **2013**. Overexpression of Avenin-Like b Proteins in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Improves Dough Mixing Properties by Their Incorporation into Glutenin Polymers. *PLOS ONE* 8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066758

Maathuis, F.J., **2009**. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 250–258. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.003

Mabood, F., Gilani, S.A., Albroumi, M., Alameri, S., Al Nabhani, M.M.O., Jabeen, F., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Boqué, R., Farooq, S., Hamaed, A.M., Naureen, Z., Khan, A., Hussain, Z., **2017**. Detection and estimation of Super premium 95 gasoline adulteration with Premium 91 gasoline using new NIR spectroscopy combined with multivariate methods. *Fuel* 197, 388–396. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.02.041

Machado, I., Mondutey, S., Pastorino, N., Arce, V., Pistón, M., **2018**. A green analytical method for the determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in wheat flour using total reflection X-ray fluorescence. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 33, 1264–1268. https://doi.org/10.1039/C8JA00144H

Maeda, H., Dudareva, N., **2012**. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 63, 73–105. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439

Maignan, V., Bernay, B., Géliot, P., Avice, J.-C., **2020**. Biostimulant effects of Glutacetine® and its derived formulations mixed with N fertilizer on post-heading N uptake and remobilization, seed yield and grain quality in winter wheat. *Frontiers in Plant Science* 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.607615

Maignan, V., Géliot, P., Avice, J.-C., **2021**. Glutacetine® Biostimulant Applied on Wheat under Contrasting Field Conditions Improves Grain Number Leading to Better Yield, Upgrades N-Related Traits and Changes Grain Ionome. *Plants* 10, 456. https://doi.org/10.3390/plants10030456

Maillard, A., Diquélou, S., Billard, V., Laîné, P., Garnica, M., Prudent, M., Garcia-Mina, J.-M., Yvin, J.-C., Ourry, A., **2015**. Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Frontiers in Plant Science* 6. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00317

Makino, A., **2011**. Photosynthesis, Grain Yield, and Nitrogen Utilization in Rice and Wheat. *Plant Physiology* 155, 125–129. https://doi.org/10.1104/pp.110.165076

Makino, A., Mae, T., Ohira, K., **1988**. Differences between wheat and rice in the enzymic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the relationship to photosynthetic gas exchange. *Planta* 174, 30–38. https://doi.org/10.1007/BF00394870

Makowski, D., Wallach, D., Meynard, J.-M., **1999**. Models of Yield, Grain Protein, and Residual Mineral Nitrogen Responses to Applied Nitrogen for Winter Wheat. *Agronomy Journal* 91, 377. https://doi.org/10.2134/agronj1999.00021962009100030005x

Malamy, J.E., Ryan, K.S., **2001**. Environmental Regulation of Lateral Root Initiation in Arabidopsis. *Plant Physiology* 127, 899–909. https://doi.org/10.1104/pp.010406

Mali, M., Aery, N.C., **2008**. Influence of Silicon on Growth, Relative Water Contents and Uptake of Silicon, Calcium and Potassium in Wheat Grown in Nutrient Solution. *Journal of Plant Nutrition* 31, 1867–1876. https://doi.org/10.1080/01904160802402666

Malik, A.H., **2012**. Governing Grain Protein Concentration and Composition in Wheat and Barley: Use of Genetic and Environmental factors. Thèse de *Swedish University of Agricultural Sciences.*

Malik, A.H., **2009**. Nutrient uptake, transport and translocation in cereals: influences of environment and farming conditions. Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science, *Swedish University of Agricultural Sciences*. ISSN 1654-3580

Manley, M., Engelbrecht, M.L., Williams, P.C., Kidd, M., **2009**. Assessment of variance in the measurement of hectolitre mass of wheat, using equipment from different grain producing and exporting countries. *Biosystems Engineering* 103, 176–186. https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2009.02.018

Mannino, G., Campobenedetto, C., Vigliante, I., Contartese, V., Gentile, C., Bertea, C.M., **2020**. The Application of a Plant Biostimulant Based on Seaweed and Yeast Extract Improved Tomato Fruit Development and Quality. *Biomolecules* 10, 1662. https://doi.org/10.3390/biom10121662

Marcussen, T., Sandve, S.R., Heier, L., Spannagl, M., Pfeifer, M., Wulff, B.B.H., Steuernagel, B., Mayer, K.F.X., Olsen, O.-A., **2014**. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science* 345(6194):1250092. https//doi.org.10.1126/science.1250092.

Marques, A.C., Lidon, F.C., Coelho, A.R.F., Pessoa, C.C., Luís, I.C., Campos, P.S., Simões, M., Almeida, A.S., Pessoa, M.F., Galhano, C., Guerra, M., Leitão, R.G., Legoinha, P., Ramalho, J.C., Semedo, J.N., Rodrigues, A.P., Marques, P., Silva, C., Ribeiro-Barros, A., Silva, M.J., Silva, M.M., Oliveira, K., Ferreira, D., Pais, I.P., Reboredo, F.H., **2021**. Effect of Rice Grain

(*Oryza sativa* L.) Enrichment with Selenium on Foliar Leaf Gas Exchanges and Accumulation of Nutrients. *Plants* 10, 288. https://doi.org/10.3390/plants10020288

Marraccini, P., Rogers, W.J., Caillet, V., Deshayes, A., Granato, D., Lausanne, F., Lechat, S., Pridmore, D., Pétiard, V., **2005**. Biochemical and molecular characterization of α-d-galactosidase from coffee beans. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 909–920. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.08.010

Martínez, D.E., Costa, M.L., Guiamet, J.J., **2008**. Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biology* 10, 15–22. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00089.x

Maryami, Z., Huertas-García, A.B., Azimi, M.R., Hernández-Espinosa, N., Payne, T., Cervantes, F., Govindan, V., Ibba, M.I., Guzman, C., **2020**. Variability for Glutenins, Gluten Quality, Iron, Zinc and Phytic Acid in a Set of One Hundred and Fifty-Eight Common Wheat Landraces from Iran. *Agronomy* 10, 1797. https://doi.org/10.3390/agronomy10111797

Masci, S., D'Ovidio, R., Lafiandra, D., Kasarda, D.D., **2000**. A 1B-coded low-molecular-weight glutenin subunit associated with quality in durum wheats shows strong similarity to a subunit present in some bread wheat cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 396–400. https://doi.org/10.1007/s001220050052

Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., Suzuki, A., **2010**. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105, 1141–1157. https://doi.org/10.1093/aob/mcq028

Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M., Orsel, M., **2008**. Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology* 10, 23–36. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00097.x

Mateo-Marín, N., Quílez, D., Isla, R., **2020**. Utility of stabilized nitrogen fertilizers to reduce nitrate leaching under optimal management practices. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 183, 567–578. https://doi.org/10.1002/jpln.201900561

Mauch, F., Dudler, R., **1993**. Differential Induction of Distinct Glutathione-S-Transferases of Wheat by Xenobiotics and by Pathogen Attack. *Plant Physiology* 102, 1193–1201. https://doi.org/10.1104/pp.102.4.1193

Mazorra-Manzano, M.A., Yada, R.Y., **2008**. Expression and characterization of the recombinant aspartic proteinase A1 from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 69, 2439–2448. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.07.012

McGrath, S.P., Zhao, F.J., Lombi, E., **2001**. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil* 232, 207–214. https://doi.org/10.1023/A:1010358708525

McLaren, T.I., Guppy, C.N., Tighe, M.K., **2012**. A Rapid and Nondestructive Plant Nutrient Analysis using Portable X-Ray Fluorescence. *Soil Science Society of America Journal* 76, 1446–1453. https://doi.org/10.2136/sssaj2011.0355

Melino, V.J., Fiene, G., Enju, A., Cai, J., Buchner, P., Heuer, S., **2015**. Genetic diversity for root plasticity and nitrogen uptake in wheat seedlings. *Functional Plant Biology* 42, 942. https://doi.org/10.1071/FP15041

Merigout, P., Lelandais, M., Bitton, F., Renou, J.-P., Briand, X., Meyer, C., Daniel-Vedele, F., **2008**. Physiological and Transcriptomic Aspects of Urea Uptake and Assimilation in *Arabidopsis* Plants. *Plant Physiology* 147, 1225–1238. https://doi.org/10.1104/pp.108.119339

Mevik, B.-H., Wehrens, R., Liland, K., **2013**. R Package: 'pls': Partial Least Squares and Principal Component regression. https://mevik.net/work/software/pls.html (accessed 04.14.21).

Meyer, D., Dimitriadou, E., Hornik, K., Weingessel, A., Leisch, F., Chang, C.-C., Lin, C.-C., **2021**. Misc Functions of the Department of Statistics, Probability Theory Group (Formerly: E1071), TU Wien. *CRAN*.

Migge, A., Bork, C., Hell, R., Becker, T.W., **2000**. Negative regulation of nitrate reductase gene expression by glutamine or asparagine accumulating in leaves of sulfur-deprived tobacco. *Planta* 211, 587–595. https://doi.org/10.1007/s004250000322

Miller, A.J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S.J., Wells, D.M., **2007**. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* 58, 2297–2306. https://doi.org/10.1093/jxb/erm066

Misselbrook, T.H., Van Der Weerden, T.J., Pain, B.F., Jarvis, S.C., Chambers, B.J., Smith, K.A., Phillips, V.R., Demmers, T.G.M., **2000**. Ammonia emission factors for UK agriculture. *Atmospheric Environment* 34, 871–880. https://doi.org/10.1016/S1352-2310(99)00350-7

Mobley, H.L., Island, M.D., Hausinger, R.P., **1995**. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological Reviews* 59, 451–480.

Mohammed, Y.A., Chen, C., Jensen, T., **2016**. Urease and Nitrification Inhibitors Impact on Winter Wheat Fertilizer Timing, Yield, and Protein Content. *Agronomy Journal* 108, 905–912. https://doi.org/10.2134/agronj2015.0391

Moll, R.H., Kamprath, E.J., Jackson, W.A., **1982**. Analysis and Interpretation of Factors Which Contribute to Efficiency of Nitrogen Utilization. *Agronomy Journal* 74, 562–564. https://doi.org/10.2134/agronj1982.00021962007400030037x

Moore, K.J., Moser, L.E., **1995**. Quantifying Developmental Morphology of Perennial Grasses. *Crop Science* 35, 37. https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500010007x

Moriarity, J.L., Hurt, K.J., Resnick, A.C., Storm, P.B., Laroy, W., Schnaar, R.L., Snyder, S.H., **2002**. UDP-glucuronate decarboxylase, a key enzyme in proteoglycan synthesis: cloning, characterization, and localization. *Journal of Biological Chemistry* 277, 16968–16975. https://doi.org/10.1074/jbc.M109316200

Mounier, E., Pervent, M., Ljung, K., Gojon, A., Nacry, P., **2014**. Auxin-mediated nitrate signalling by NRT1.1 participates in the adaptive response of *Arabidopsis* root architecture to the spatial heterogeneity of nitrate availability: Nitrate signalling by NRT1.1. *Plant, Cell & Environment* 37, 162–174. https://doi.org/10.1111/pce.12143

Msimbira, L.A., Smith, D.L., **2020**. The Roles of Plant Growth Promoting Microbes in Enhancing Plant Tolerance to Acidity and Alkalinity Stresses. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 4. https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00106

Mueller-Roeber, B., Balazadeh, S., **2014**. Auxin and Its Role in Plant Senescence. *Journal of Plant Growth Regulation* 33, 21–33. https://doi.org/10.1007/s00344-013-9398-5

Mujico, J.R., Mitea, C., Gilissen, L.J.W.J., de Ru, A., van Veelen, P., Smulders, M.J.M., Koning, F., **2011**. Natural variation in avenin epitopes among oat varieties: Implications for celiac disease. *Journal of Cereal Science* 54, 8–12. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.09.007

Mumolo, M.G., Rettura, F., Melissari, S., Costa, F., Ricchiuti, A., Ceccarelli, L., de Bortoli, N., Marchi, S., Bellini, M., **2020**. Is Gluten the Only Culprit for Non-Celiac Gluten/Wheat Sensitivity? *Nutrients* 12, 3785. https://doi.org/10.3390/nu12123785

N

Nadaud, I., Tasleem-Tahir, A., Chateigner-Boutin, A.-L., Chambon, C., Viala, D., Branlard, G., 2015. Proteome evolution of wheat (*Triticum aestivum* L.) aleurone layer at fifteen stages

of grain development. *Journal of Proteomics* 123, 29–41. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.008

Naeem, H.A., Paulon, D., Irmak, S., MacRitchie, F., **2012**. Developmental and environmental effects on the assembly of glutenin polymers and the impact on grain quality of wheat. *Journal of Cereal Science* 56, 51–57. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.10.014

Nastri, A., Toderi, G., Bernati, E., Govi, G., **2000**. Ammonia volatilization and yield response from urea applied to wheat with urease (NBPT) and nitrification (DCD) inhibitors. *Agrochimica* 44, 231–239.

Navazio, L., Formentin, E., Cendron, L., Szabò, I., **2020**. Chloroplast Calcium Signaling in the Spotlight. *Frontiers in Plant Science* 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00186

Nazoa, P., Vidmar, J.J., Tranbarger, T.J., Mouline, K., Tillard, P., Zhuo, D., Glass, A.D.M., Touraine, B., **2003**. Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Molecular Biology* 52: 689–703

Nehe, A.S., Misra, S., Murchie, E.H., Chinnathambi, K., Singh Tyagi, B., Foulkes, M.J., **2020**. Nitrogen partitioning and remobilization in relation to leaf senescence, grain yield and protein concentration in Indian wheat cultivars. *Field Crops Research* 251, 107778. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2020.107778

Nguyen, M.L., Glaes, J., Spaepen, S., Bodson, B., Jardin, P. du, Delaplace, P., **2019**. Biostimulant effects of *Bacillus* strains on wheat from in vitro towards field conditions are modulated by nitrogen supply. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 182, 325–334. https://doi.org/10.1002/jpln.201700610

Nicoulaud, B.A.L., Bloom, A.J., **1996**. Absorption and Assimilation of Foliarly Applied Urea in Tomato. *American Society for Horticultural Science*. ISSN 0003-1062

Nie, Z., Zhao, P., Shi, H., Wang, Y., Qin, S., Liu, H., **2019**. Nitrogen supply enhances zinc uptake and root-to-shoot translocation via up-regulating the expression of TaZIP3 and TaZIP7 in winter wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Soil* 444, 501–517. https://doi.org/10.1007/s11104-019-04295-4

Nigro, D., Blanco, A., Anderson, O.D., Gadaleta, A., **2014**. Characterization of Ferredoxin-Dependent Glutamine-Oxoglutarate Amidotransferase (Fd-GOGAT) Genes and Their Relationship with Grain Protein Content QTL in Wheat. *PLOS ONE* 9, e103869. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103869

Nikiforova, V.J., Kopka, J., Tolstikov, V., Fiehn, O., Hopkins, L., Hawkesford, M.J., Hesse, H., Hoefgen, R., **2005**. Systems Rebalancing of Metabolism in Response to Sulfur Deprivation, as Revealed by Metabolome Analysis of *Arabidopsis* Plants. *Plant Physiology* 138, 304–318. https://doi.org/10.1104/pp.104.053793

Nikolajsen, M.T., Pacholski, A.S., Sommer, S.G., **2020**. Urea Ammonium Nitrate Solution Treated with Inhibitor Technology: Effects on Ammonia Emission Reduction, Wheat Yield, and Inorganic N in Soil. *Agronomy* 10, 161. https://doi.org/10.3390/agronomy10020161

Ninnemann, O., Jauniaux, J.C., Frommer, W.B., **1994**. Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. *The EMBO Journal* 13, 3464–3471. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06652.x

O

Okamoto, M., Vidmar, J.J., Glass, A.D.M., **2003**. Regulation of NRT1 and NRT2 Gene Families of *Arabidopsis thaliana*: Responses to Nitrate Provision. *Plant and Cell Physiology* 44, 304–317. https://doi.org/10.1093/pcp/pcg036

Omara, P., Aula, L., Oyebiyi, F.B., Eickhoff, E.M., Carpenter, J., Raun, W.R., **2020**. Biochar Application in Combination with Inorganic Nitrogen Improves Maize Grain Yield, Nitrogen Uptake, and Use Efficiency in Temperate Soils. *Agronomy* 10, 1241. https://doi.org/10.3390/agronomy10091241

Orsel, M., **2002**. Analysis of the NRT2 Nitrate Transporter Family in *Arabidopsis*. Structure and Gene Expression. *Plant Physiology* 129, 886–896. https://doi.org/10.1104/pp.005280

Orsel, M., Chopin, F., Leleu, O., Smith, S.J., Krapp, A., Daniel-Vedele, F., Miller, A.J., **2006**. Characterization of a Two-Component High-Affinity Nitrate Uptake System in *Arabidopsis*. Physiology and Protein-Protein Interaction. *Plant Physiology* 142, 1304–1317. https://doi.org/10.1104/pp.106.085209

Osborne, T.B., Thomas B., **1909**. The vegetable proteins, *University of California*. ed. Longmans, Green and Co.

Osborne, T.B., Thomas B., **1907**. The proteins of the wheat kernel. Washington, D.C.: *Carnegie Institution of Washington.*

Oscarson, P., **2000**. The strategy of the wheat plant in acclimating growth and grain production to nitrogen availability. *Journal of Experimental Botany* 51, 1921–1929. https://doi.org/10.1093/jexbot/51.352.1921

Ouellet, F., Carpentier, É., Cope, M.J.T.V., Monroy, A.F., Sarhan, F., **2001**. Regulation of a Wheat Actin-Depolymerizing Factor during Cold Acclimation. *Plant Physiology* 125, 360–368. https://doi.org/10.1104/pp.125.1.360

Oury, F.-X., Leenhardt, F., Rémésy, C., Chanliaud, E., Duperrier, B., Balfourier, F., Charmet, G., *2006*. Genetic variability and stability of grain magnesium, zinc and iron concentrations in bread wheat. *European Journal of Agronomy* 25, 177–185. https://doi.org/10.1016/j.eja.2006.04.011

Owens, D.B., McCann, M.E.E., McCracken, K.J., Park, R.S., **2009**. Prediction of wheat chemical and physical characteristics and nutritive value by near-infrared reflectance spectroscopy. *British Poultry Science* 50, 103–122. https://doi.org/10.1080/00071660802635347

P

Paltridge, N.G., Milham, P.J., Ortiz-Monasterio, J.I., Velu, G., Yasmin, Z., Palmer, L.J., Guild, G.E., Stangoulis, J.C.R., **2012**. Energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry as a tool for zinc, iron and selenium analysis in whole grain wheat. *Plant and Soil* 361, 261–269. https://doi.org/10.1007/s11104-012-1423-0

Pan, W.L., Kidwell, K.K., McCracken, V.A., Bolton, R.P., Allen, M., **2020**. Economically Optimal Wheat Yield, Protein and Nitrogen Use Component Responses to Varying N Supply and Genotype. *Frontiers in Plant Science* 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01790

Parveen, A., Liu, W., Hussain, S., Asghar, J., Perveen, S., Xiong, Y., **2019**. Silicon Priming Regulates Morpho-Physiological Growth and Oxidative Metabolism in Maize under Drought Stress. *Plants* 8. https://doi.org/10.3390/plants8100431

Paul, K., Sorrentino, M., Lucini, L., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., Reynaud, H., Canaguier, R., Trtílek, M., Panzarová, K., Colla, G., **2019**. Understanding the Biostimulant Action of Vegetal-Derived Protein Hydrolysates by High-Throughput Plant Phenotyping

and Metabolomics: A Case Study on Tomato. *Frontiers in Plant Science* 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00047

Pauly, A., Pareyt, B., Fierens, E., Delcour, J.A., **2013**. Wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. turgidum* L. ssp. *durum*) Kernel Hardness: Current View on the Role of Puroindolines and Polar Lipids. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12, 413–426. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12019

Pearce, S., Tabbita, F., Cantu, D., Buffalo, V., Avni, R., Vazquez-Gross, H., Zhao, R., Conley, C.J., Distelfeld, A., Dubcovksy, J., **2014**. Regulation of Zn and Fe transporters by the GPC1 gene during early wheat monocarpic senescence. *BMC Plant Biology* 14, 368. https://doi.org/10.1186/s12870-014-0368-2

Pérez-de-los-Reyes, C., Amorós Ortíz-Villajos, J.A., García Navarro, F.J., Bravo Martín-Consuegra, S., Jiménez Ballesta, R., **2013**. Grapevine leaf uptake of mineral elements influenced by sugar foam amendment of an acidic soil. *Vitis* 52, 157–164.

Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D.J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Pérez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, S., Tiwary, S., Cox, J., Audain, E., Walzer, M., Jarnuczak, A.F., Ternent, T., Brazma, A., Vizcaíno, J.A., **2019**. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Research* 47, D442–D450. https://doi.org/10.1093/nar/gky1106

Peris-Felipo, F.J., Benavent-Gil, Y., Hernández-Apaolaza, L., **2020**. Silicon beneficial effects on yield, fruit quality and shelf-life of strawberries grown in different culture substrates under different iron status. *Plant Physiology and Biochemistry*. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.04.026

Perrier, F., Yan, B., Candaudap, F., Pokrovsky, O.S., Gourdain, E., Meleard, B., Bussière, S., Coriou, C., Robert, T., Nguyen, C., Cornu, J.Y., **2016**. Variability in grain cadmium concentration among durum wheat cultivars: impact of aboveground biomass partitioning. *Plant Soil* 404, 307–320. https://doi.org/10.1007/s11104-016-2847-8

Perrin, L., Allès, B., Buscail, C., Ravel, C., Hercberg, S., Julia, C., Kesse-Guyot, E., **2019**. Gluten-free diet in French adults without coeliac disease: sociodemographic characteristics, motives and dietary profile. *British Journal of Nutrition* 122, 231–239. https://doi.org/10.1017/S0007114519001053

Perveen, S., Ahmad, S., Skalicky, M., Hussain, I., Habibur-Rahman, M., Ghaffar, A., Shafqat Bashir, M., Batool, M., Hassan, M.M., Brestic, M., Fahad, S., EL Sabagh, A., **2021**. Assessing the Potential of Polymer Coated Urea and Sulphur Fertilization on Growth, Physiology, Yield, Oil Contents and Nitrogen Use Efficiency of Sunflower Crop under Arid Environment. *Agronomy* 11, 269. https://doi.org/10.3390/agronomy11020269

Pichereaux, C., Laurent, E.-A., Gargaros, A., Viudes, S., Durieu, C., Lamaze, T., Grieu, P., Burlet-Schiltz, O., **2019**. Analysis of durum wheat proteome changes under marine and fungal biostimulant treatments using large-scale quantitative proteomics: A useful dataset of durum wheat proteins. *Journal of Proteomics* 200, 28–39. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.03.003

Plessis, A., Ravel, C., Bordes, J., Balfourier, F., Martre, P., **2013**. Association study of wheat grain protein composition reveals that gliadin and glutenin composition are trans-regulated by different chromosome regions. *Journal of Experimental Botany* 64, 3627–3644. https://doi.org/10.1093/jxb/ert188

Poberężny, J., Szczepanek, M., Wszelaczyńska, E., Prus, P., **2020**. The Quality of Carrot after Field Biostimulant Application and after Storage. *Sustainability* 12, 1386. https://doi.org/10.3390/su12041386

Poisson, E., Trouverie, J., Brunel-Muguet, S., Akmouche, Y., Pontet, C., Pinochet, X., Avice, J.-C., **2019**. Seed Yield Components and Seed Quality of Oilseed Rape Are Impacted by Sulfur Fertilization and Its Interactions With Nitrogen Fertilization. *Frontiers in Plant Science* 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00458

Polo, J., Mata, P., **2017**. Evaluation of a Biostimulant (Pepton) Based in Enzymatic Hydrolyzed Animal Protein in Comparison to Seaweed Extracts on Root Development, Vegetative Growth, Flowering, and Yield of Gold Cherry Tomatoes Grown under Low Stress Ambient Field Conditions. *Frontiers in Plant Science* 8, 2261. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02261

Popko, M., Michalak, I., Wilk, R., Gramza, M., Chojnacka, K., Górecki, H., **2018**. Effect of the New Plant Growth Biostimulants Based on Amino Acids on Yield and Grain Quality of Winter Wheat. *Molecules* 23, 470. https://doi.org/10.3390/molecules23020470

Power, J.F., Alessi, J., 1978. Tiller development and yield of standard and semidwarf spring wheat varieties as affected by nitrogen fertilizer. *The Journal of Agricultural Science* 90, 97. https://doi.org/10.1017/S0021859600048632

Pramanik, P., Safique, S., Zahan, A., Phukan, M., Ghosh, S., **2017**. Cellulolytic microorganisms control the availability of nitrogen in microcosm of shredded pruning litter treated highly acidic tea-growing soils of Assam in Northeast India. *Applied Soil Ecology* 120, 30–34. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.07.026

Pretini, N., Terrile, I.I., Gazaba, L.N., Donaire, G.M., Arisnabarreta, S., Vanzetti, L.S., González, F.G., **2020**. A Comprehensive Study of Spike Fruiting Efficiency in Wheat. *Crop Science*. https://doi.org/10.1002/csc2.20143

Pronin, D., Börner, A., Weber, H., Scherf, K.A., **2020**. Wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding from 1891 to 2010 contributed to increasing yield and glutenin contents but decreasing protein and gliadin contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02815

Q

Qiao, K., Wang, F., Liang, S., Wang, H., Hu, Z., Chai, T., **2019**. New Biofortification Tool: Wheat TaCNR5 Enhances Zinc and Manganese Tolerance and Increases Zinc and Manganese Accumulation in Rice Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67, 9877–9884. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04210

Quemada, M., Gabriel, J.L., Zarco-Tejada, P., **2014**. Airborne Hyperspectral Images and Ground-Level Optical Sensors As Assessment Tools for Maize Nitrogen Fertilization. *Remote Sensing* 6, 2940–2962. https://doi.org/10.3390/rs6042940

Quraishi, U.M., Abrouk, M., Murat, F., Pont, C., Foucrier, S., Desmaizieres, G., Confolent, C., Rivière, N., Charmet, G., Paux, E., Murigneux, A., Guerreiro, L., Lafarge, S., Le Gouis, J., Feuillet, C., Salse, J., **2011**. Cross-genome map based dissection of a nitrogen use efficiency ortho-metaQTL in bread wheat unravels concerted cereal genome evolution: Concerted genome evolution of a NUE metaQTL in cereals. *The Plant Journal* 65, 745–756. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04461.x

R

R Core Team, **2020**. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.

Räbiger, T., Andres, M., Hegewald, H., Kesenheimer, K., Köbke, S., Quinones, T.S., Böttcher, U., Kage, H., **2020**. Indirect nitrous oxide emissions from oilseed rape cropping systems by NH_3 volatilization and nitrate leaching as affected by nitrogen source, N rate and site conditions. *European Journal of Agronomy* 116, 126039. https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126039

Raboy, V., **2020**. Low phytic acid Crops: Observations Based On Four Decades of Research. *Plants* 9, 140. https://doi.org/10.3390/plants9020140

Rafique, M., Naveed, M., Mustafa, A., Akhtar, S., Munawar, M., Kaukab, S., Ali, H.M., Siddiqui, M.H., Salem, M.Z.M., **2021**. The Combined Effects of Gibberellic Acid and *Rhizobium* on Growth, Yield and Nutritional Status in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Agronomy* 11, 105. https://doi.org/10.3390/agronomy11010105

Rahimi, S., Talebi, M., Baninasab, B., Gholami, M., Zarei, M., Shariatmadari, H., **2020**. The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in improving iron acquisition by altering physiological and molecular responses in quince seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.045

Ramanantenasoa, M.M.J., Génermont, S., Gilliot, J.-M., Bedos, C., Makowski, D., **2019**. Meta-modeling methods for estimating ammonia volatilization from nitrogen fertilizer and manure applications. *Journal of Environmental Management* 236, 195–205. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.01.066

Ramos, I., Pataco, I.M., Mourinho, M.P., Lidon, F., Reboredo, F., Pessoa, M.F., Carvalho, M.L., Santos, J.P., Guerra, M., **2016**. Elemental mapping of biofortified wheat grains using microX-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta* 120, 30–36. https://doi.org/10.1016/j.sab.2016.03.014

Ramzani, P.M.A., Khalid, M., Naveed, M., Ahmad, R., Shahid, M., **2016**. Iron biofortification of wheat grains through integrated use of organic and chemical fertilizers in pH affected calcareous soil. *Plant Physiology and Biochemistry* 104, 284–293. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.053

Ranjan, R., Yadav, R., **2020**. Genetics analysis of nitrogen use efficiency component traits under nitrogen-limiting environment. *Cereal Research Communications*. https://doi.org/10.1007/s42976-020-00063-8

Raven, J.A., Wollenweber, B., Handley, L.L., **1992**. A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs. *New Phytologist* 121, 19–32. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01088.x

Ravier, C., Quemada, M., Jeuffroy, M.-H., **2017**. Use of a chlorophyll meter to assess nitrogen nutrition index during the growth cycle in winter wheat. *Field Crops Research* 214, 73–82. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.08.023

Rawat, S.R., Silim, S.N., Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., **1999**. AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *The Plant Journal* 19, 143–152. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00505.x

Recio, J., Vallejo, A., Le-Noë, J., Garnier, J., García-Marco, S., Álvarez, J.M., Sanz-Cobena, A., **2018**. The effect of nitrification inhibitors on NH_3 and N_2O emissions in highly N fertilized

irrigated Mediterranean cropping systems. *Science of The Total Environment* 636, 427–436. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.294

Rehman, A., Farooq, M., Nawaz, A., Al-Sadi, A.M., Al-Hashmi, K.S., Nadeem, F., Ullah, A., **2018**. Characterizing bread wheat genotypes of Pakistani origin for grain zinc biofortification potential. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98, 4824–4836. https://doi.org/10.1002/jsfa.9010

Rekowski, A., Wimmer, M.A., Hitzmann, B., Hermannseder, B., Hahn, H., Zörb, C., **2020**. Application of urease inhibitor improves protein composition and bread-baking quality of urea fertilized winter wheat. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. https://doi.org/10.1002/jpln.201900529

Ricci, M., Tilbury, L., Daridon, B., Sukalac, K., **2019**. General Principles to Justify Plant Biostimulant Claims. *Frontiers in Plant Science* 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00494

Rivera-Amado, C., Molero, G., Trujillo-Negrellos, E., Reynolds, M., Foulkes, J., **2020**. Estimating Organ Contribution to Grain Filling and Potential for Source Upregulation in Wheat Cultivars with a Contrasting Source–Sink Balance. *Agronomy* 10, 1527. https://doi.org/10.3390/agronomy10101527

Rizwan, M., Meunier, J.-D., Miche, H., Keller, C., **2012**. Effect of silicon on reducing cadmium toxicity in durum wheat (*Triticum turgidum* L. cv. Claudio W.) grown in a soil with aged contamination. *Journal of Hazardous Materials* 209–210, 326–334. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.01.033

Rodrigues, M., Baptistella, J.L.C., Horz, D.C., Bortolato, L.M., Mazzafera, P., **2020**. Organic Plant Biostimulants and Fruit Quality - A Review. *Agronomy* 10, 988. https://doi.org/10.3390/agronomy10070988

Romero, C.M., Engel, R.E., Chen, C., Wallander, R., Jones, C.A., **2017**. Late-Fall, Winter, and Spring Broadcast Applications of Urea to No-Till Winter Wheat, Fertilizer N recovery, Yield, and Protein as Affected by NBPT. *Soil Science Society of America Journal* 81, 331–340. https://doi.org/10.2136/sssaj2016.10.0333

Rosa-Téllez, S., Anoman, A.D., Flores-Tornero, M., Toujani, W., Alseek, S., Fernie, A.R., Nebauer, S.G., Muñoz-Bertomeu, J., Segura, J., Ros, R., **2018**. Phosphoglycerate Kinases Are Co-Regulated to Adjust Metabolism and to Optimize Growth. *Plant Physiology* 176, 1182–1198. https://doi.org/10.1104/pp.17.01227

Rose, T.J., Raymond, C.A., Bloomfield, C., King, G.J., **2015**. Perturbation of nutrient source–sink relationships by post-anthesis stresses results in differential accumulation of nutrients in wheat grain. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 178, 89–98. https://doi.org/10.1002/jpln.201400272

Roslan, M.A.M., Zulkifli, N.N., Sobri, Z.M., Zuan, A.T.K., Cheak, S.C., Rahman, N.A.A., **2020**. Seed biopriming with P- and K-solubilizing *Enterobacter hormaechei* sp. improves the early vegetative growth and the P and K uptake of okra (*Abelmoschus esculentus*) seedling. *PLOS ONE* 15, e0232860. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232860

Rossini, F., Provenzano, M.E., Sestili, F., Ruggeri, R., **2018**. Synergistic Effect of Sulfur and Nitrogen in the Organic and Mineral Fertilization of Durum Wheat: Grain Yield and Quality Traits in the Mediterranean Environment. *Agronomy* 8, 189. https://doi.org/10.3390/agronomy8090189

Rossmann, A., Buchner, P., Savill, G.P., Hawkesford, M.J., Scherf, K.A., Mühling, K.H., **2019**. Foliar N application at anthesis alters grain protein composition and enhances baking

quality in winter wheat only under a low N fertiliser regimen. *European Journal of Agronomy* 109. https://doi.org/10.1016/j.eja.2019.04.004

Rossmann, A., Scherf, K.A., Rühl, G., Greef, J.M., Mühling, K.H., **2020**. Effects of a late N fertiliser dose on storage protein composition and bread volume of two wheat varieties differing in quality. *Journal of Cereal Science* 102944. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.102944

Rouphael, Y., Carillo, P., Colla, G., Fiorentino, N., Sabatino, L., El-Nakhel, C., Giordano, M., Pannico, A., Cirillo, V., Shabani, E., Cozzolino, E., Lombardi, N., Napolitano, M., Woo, S.L., **2020**. Appraisal of Combined Applications of *Trichoderma* virens and a Biopolymer-Based Biostimulant on Lettuce Agronomical, Physiological, and Qualitative Properties under Variable N Regimes. *Agronomy* 10, 196. https://doi.org/10.3390/agronomy10020196

Rouphael, Y., Colla, G., **2020**. Editorial: Biostimulants in Agriculture. *Frontiers in Plant Science* 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040

Rouphael, Y., Colla, G., **2018**. Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science* 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01655

Rouphael, Y., Giordano, M., Cardarelli, M., Cozzolino, E., Mori, M., Kyriacou, M.C., Bonini, P., Colla, G., **2018**. Plant- and Seaweed-Based Extracts Increase Yield but Differentially Modulate Nutritional Quality of Greenhouse Spinach through Biostimulant Action. *Agronomy* 8, 126. https://doi.org/10.3390/agronomy8070126

Ryu, M.Y., Cho, S.K., Kim, W.T., **2010**. The *Arabidopsis* C3H2C3-type RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP1 is a positive regulator of an abscisic acid-dependent response to drought stress. *Plant Physiology* 154, 1983–1997. https://doi.org/10.1104/pp.110.164749

S

Sabelli, P.A., Larkins, B.A., **2009**. The Development of Endosperm in Grasses. *Plant Physiology* 149, 14–26. https://doi.org/10.1104/pp.108.129437

Safar-Noori, M., Dong, Q., Saneoka, H., **2018**. Improvement of Grain Yield, Nutritional and Antinutritional Quality, and Seed Physiological Performance of Wheat by NPK Fertilization. *Journal of Agricultural Science and Technology* 20, 1467–1477.

Salon, C., Bataillé, M.-P., Gallardo, K., Jeudy, C., Santoni, A.-L., Trouverie, J., Voisin, A.-S., Avice, J.-C., **2014**. ^{34}S and ^{15}N Labelling to Model S and N Flux in Plants and Determine the Different Components of N and S Use Efficiency, *Methods in Molecular Biology* pp. 335–346. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-688-7_20

Santamaria, P., **2006**. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 10–17. https://doi.org/10.1002/jsfa.2351

Santner, A., Estelle, M., **2010**. The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant Journal* 61, 1029–1040. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04112.x

Sarwar, N., Saifullah, Malhi, S.S., Zia, M.H., Naeem, A., Bibi, S., Farid, G., **2010**. Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 925–937. https://doi.org/10.1002/jsfa.3916

Sekula, B., Ruszkowski, M., Dauter, Z., **2018**. Structural Analysis of Phosphoserine Aminotransferase (Isoform 1) From *Arabidopsis thaliana*– the Enzyme Involved in the Phosphorylated Pathway of Serine Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00876

Sergi, C., Villanacci, V., Carroccio, A., **2021**. Non-celiac wheat sensitivity: rationality and irrationality of a gluten-free diet in individuals affected with non-celiac disease: a review. *BMC Gastroenterology* 21, 5. https://doi.org/10.1186/s12876-020-01568-6

Sestili, F., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Pucci, A., Bonini, P., Canaguier, R., Colla, G., **2018**. Protein Hydrolysate Stimulates Growth in Tomato Coupled With N-Dependent Gene Expression Involved in N Assimilation. *Frontiers in Plant Science* 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01233

Sexton, P.J., Bohle, M.G., Simmons, R.B., Karow, R.S., Marx, E., Christensen, N.W., Shibley, T., **2006**. Effect of Nitrogen Topdressing at Anthesis and the Association of Flag-Leaf Nitrogen with Grain Protein Concentration in Irrigated Spring Wheat. *Journal of Plant Nutrition* 29, 1035–1046. https://doi.org/10.1080/01904160600686197

Shewry, P.R., **2009**. Wheat. *Journal of Experimental Botany* 60, 1537–1553. https://doi.org/10.1093/jxb/erp058

Shewry, P.R., Halford, N.G., Lafiandra, D., **2003**. Genetics of wheat gluten proteins. *Advanced Genetics* 49, 111–184.

Shewry, P.R., Hey, S.J., **2015**. The contribution of wheat to human diet and health. *Food and Energy Security* 4, 178–202. https://doi.org/10.1002/fes3.64

Shewry, P.R., Lafiandra, D., Bedo, Z., **2012**. Improving the nutritional quality and health benefits of wheat. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 4, 136–136. https://doi.org/10.1111/j.1757-837X.2012.00138.x

Shewry, P.R., Tatham, A.S., **2016**. Improving wheat to remove coeliac epitopes but retain functionality. *Journal of Cereal Science* 67, 12–21. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.06.005

Shewry, P.R., Tatham, A.S., **1997**. Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *Journal of Cereal Science* 25, 207–227. https://doi.org/10.1006/jcrs.1996.0100

Shin, S., Mackintosh, C.A., Lewis, J., Heinen, S.J., Radmer, L., Dill-Macky, R., Baldridge, G.D., Zeyen, R.J., Muehlbauer, G.J., **2008**. Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany* 59, 2371–2378. https://doi.org/10.1093/jxb/ern103

Shukla, S., Saxena, A., **2020**. Sources and leaching of nitrate contamination in groundwater. *Current Science* (00113891) 118, 883–891. https://doi.org/10.18520/cs/v118/i6/883-891

Silva-Pérez, V., De Faveri, J., Molero, G., Deery, D.M., Condon, A.G., Reynolds, M.P., Evans, J.R., Furbank, R.T., **2020**. Genetic variation for photosynthetic capacity and efficiency in spring wheat. *Journal of Experimental Botany* 71, 2299–2311. https://doi.org/10.1093/jxb/erz439

Sinclair, T.R., Jamieson, P.D., **2006**. Grain number, wheat yield, and bottling beer: An analysis. *Field Crops Research* 98, 60–67. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.12.006

Singh, B.R., Timsina, Y.N., Lind, O.C., Cagno, S., Janssens, K., **2018**. Zinc and Iron Concentration as Affected by Nitrogen Fertilization and Their Localization in Wheat Grain. *Frontiers in Plant Science* 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00307

Sirko, A., Masclaux-Daubresse, C., **2021**. Advances in Plant Autophagy. *Cells* 10, 194. https://doi.org/10.3390/cells10010194

Siwik-Ziomek, A., Szczepanek, M., **2018**. Soil enzyme activity and sulphur uptake by oilseed rape depending on fertilization and biostimulant application. *Acta Agriculturae Scandinavica* 68, 50–56. https://doi.org/10.1080/09064710.2017.1358762

Slafer, G.A., Elia, M., Savin, R., García, G.A., Terrile, I.I., Ferrante, A., Miralles, D.J., González, F.G., **2015**. Fruiting efficiency: an alternative trait to further rise wheat yield. *Food and Energy Security* 4, 92–109. https://doi.org/10.1002/fes3.59

Sobolewska, M., Wenda-Piesik, A., Jaroszewska, A., Stankowski, S., **2020**. Effect of Habitat and Foliar Fertilization with K, Zn and Mn on Winter Wheat Grain and Baking Qualities. *Agronomy* 10, 276. https://doi.org/10.3390/agronomy10020276

Søgaard, R., Alsterfjord, M., MacAulay, N., Zeuthen, T., **2009**. Ammonium ion transport by the AMT/Rh homolog TaAMT1;1 is stimulated by acidic pH. *European Journal of Physiology* 458, 733–743. https://doi.org/10.1007/s00424-009-0665-z

Sohlenkamp, C., **2002**. Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a High-Affinity Ammonium Transporter of the Plasma Membrane. *Plant Physiology* 130, 1788–1796. https://doi.org/10.1104/pp.008599

Sollid, L.M., Qiao, S.-W., Anderson, R.P., Gianfrani, C., Koning, F., **2012**. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics* 64, 455–460. https://doi.org/10.1007/s00251-012-0599-z

Song, X., Yang, G., Yang, C., Wang, J., Cui, B., **2017**. Spatial Variability Analysis of Within-Field Winter Wheat Nitrogen and Grain Quality Using Canopy Fluorescence Sensor Measurements. *Remote Sensing* 9, 237. https://doi.org/10.3390/rs9030237

Song, Y., Zheng, Q., **2008**. Influence of gliadin removal on strain hardening of hydrated wheat gluten during equibiaxial extensional deformation. *Journal of Cereal Science* 48, 58–67. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.08.001

Sosulski, F.W., Imafidon, G.I., **1990**. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 1351–1356. https://doi.org/10.1021/jf00096a011

Soto, G., Fox, R., Ayub, N., Alleva, K., Guaimas, F., Erijman, E.J., Mazzella, A., Amodeo, G., Muschietti, J., **2010**. TIP5;1 is an aquaporin specifically targeted to pollen mitochondria and is probably involved in nitrogen remobilization in *Arabidopsis thaliana*: TIP5;1 is expressed in pollen mitochondria. *The Plant Journal* 64, 1038–1047. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04395.x

Stevens, A., Ramirez-Lopez, L., **2020**. An introduction to the prospectr package. *R package version 0.2.1.*

Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M.M.B., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M., 2013. Résumé à l'intention des décideurs 34. *IPCC*

Styczen, M.E., Abrahamsen, P., Hansen, S., Knudsen, L., **2020**. Analysis of the significant drop in protein content in Danish grain crops from 1990-2015 based on N-response in fertilizer trials. *European Journal of Agronomy* 115, 126013. https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126013

Su, C.-L., Zhang, F.-M., Sun, K., Zhang, W., Dai, C.-C., **2019**. Fungal Endophyte *Phomopsis liquidambari* Improves Iron and Molybdenum Nutrition Uptake of Peanut in Consecutive Monoculture Soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 19, 71–80. https://doi.org/10.1007/s42729-019-0011-2

Su, T., Li, X., Yang, M., Shao, Q., Zhao, Y., Ma, C., Wang, P., **2020**. Autophagy: An Intracellular Degradation Pathway Regulating Plant Survival and Stress Response. *Frontiers in Plant Science* 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00164

Subbarao, Ganesh, Aftab Hussain, **2015**. Bio Stimulant Activity of Protein Hydrolysate: Influence on Plant Growth and Yield. *Journal of Plant Science and Research* 2(2): 125.

Sumiyoshi, M., Inamura, T., Nakamura, A., Aohara, T., Ishii, T., Satoh, S., Iwai, H., **2015**. UDP-Arabinopyranose Mutase 3 is Required for Pollen Wall Morphogenesis in Rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell Physiology* 56, 232–241. https://doi.org/10.1093/pcp/pcu132

Sun, H., Shi, W., Zhou, M., Ma, X., Zhang, H., **2019**. Effect of biochar on nitrogen use efficiency, grain yield and amino acid content of wheat cultivated on saline soil. *Plant, Soil and Environment* 65, 83–89. https://doi.org/10.17221/525/2018-PSE

Sun, H., Zhou, S., Zhang, J., Zhang, X., Wang, C., **2020**. Effects of controlled-release fertilizer on rice grain yield, nitrogen use efficiency, and greenhouse gas emissions in a paddy field with straw incorporation. *Field Crops Research* 253, 107814. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2020.107814

Sun, Y., Song, K., Sun, L., Qin, Q., Jiang, T., Jiang, Q., Xue, Y., **2020**. Morpho-physiological and transcriptome analysis provide insights into the effects of zinc application on nitrogen accumulation and metabolism in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.038

Sun, Y.-L., Hong, S.-K., **2010**. Effects of plant growth regulators and l-glutamic acid on shoot organogenesis in the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100, 317–328. https://doi.org/10.1007/s11240-009-9653-4

Surget, A., Barron, C., **2005**. Histologie du grain de blé. *Industrie des Céréales*.

Szawłowska, U., Zdunek-Zastocka, E., Bielawski, W., **2011**. Biochemical characterisation of prolyl aminopeptidase from shoots of triticale seedlings and its activity changes in response to suboptimal growth conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 1342–1349. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.05.008

T

Tabak, M., Lepiarczyk, A., Filipek-Mazur, B., Lisowska, A., **2020**. Efficiency of Nitrogen Fertilization of Winter Wheat Depending on Sulfur Fertilization. *Agronomy* 10, 1304. https://doi.org/10.3390/agronomy10091304

Tang, C., Deng, L., Chang, D., Chen, S., Wang, X., Kang, Z., **2016**. TaADF3, an Actin-Depolymerizing Factor, Negatively Modulates Wheat Resistance Against *Puccinia striiformis*. *Frontiers in Plant Science* 6. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01214

Taulemesse, F., Gouis, J.L., Gouache, D., Gibon, Y., Allard, V., **2016**. Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Grain Protein Concentration Is Related to Early Post-Flowering Nitrate Uptake under Putative Control of Plant Satiety Level. *PLOS ONE* 11, e0149668. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149668

Taulemesse, F., Gouis, J.L., Gouache, D., Gibon, Y., Allard, V., **2015**. Post-Flowering Nitrate Uptake in Wheat Is Controlled by N Status at Flowering, with a Putative Major Role of Root Nitrate Transporter NRT2.1. *PLOS ONE* 10, e0120291. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120291

Tedone, L., Alhajj Ali, S., Verdini, L., De Mastro, G., **2018**. Nitrogen management strategy for optimizing agronomic and environmental performance of rainfed durum wheat under Mediterranean climate. *Journal of Cleaner Production* 172, 2058–2074. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.215

Teixeira, W.F., Fagan, E.B., Soares, L.H., Soares, J.N., Reichardt, K., Neto, D.D., **2018**. Seed and Foliar Application of Amino Acids Improve Variables of Nitrogen Metabolism and Productivity in Soybean Crop. *Frontiers in Plant Science* 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00396

Tejos, R., Rodriguez-Furlán, C., Adamowski, M., Sauer, M., Norambuena, L., Friml, J., **2018**. PATELLINS are regulators of auxin-mediated PIN1 relocation and plant development in Arabidopsis thaliana. *Journal of Cell Science* 131. https://doi.org/10.1242/jcs.204198

Thapa, R., Mirsky, S.B., Tully, K.L., **2018**. Cover Crops Reduce Nitrate Leaching in Agroecosystems:A Global Meta-Analysis. *Journal of Environmental Quality* 47, 1400–1411. https://doi.org/10.2134/jeq2018.03.0107

The International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC), **2018**. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361, eaar7191. https://doi.org/10.1126/science.aar7191

Thomas, H., Howarth, C.J., **2000**. Five ways to stay green. *Journal of Experimental Botany* 51, 329–337. https://doi.org/10.1093/jexbot/51.suppl_1.329

Thor, K., **2019**. Calcium—Nutrient and Messenger. *Frontiers in Plant Science* 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00440

Tian, S., Lu, L., Xie, R., Zhang, M., Jernstedt, J., Hou, D., Ramsier, C., Brown, P., **2015**. Supplemental macronutrients and microbial fermentation products improve the uptake and transport of foliar applied zinc in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. Studies utilizing microX-ray florescence. *Frontiers in Plant Science* 5. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00808

Tian, W., Chen, G., Zhang, G., Wang, D., Tilley, M., Li, Y., **2021**. Rapid determination of total phenolic content of whole wheat flour using near-infrared spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry* 344, 128633. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128633

Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S., **2002**. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671–677. https://doi.org/10.1038/nature01014

Todd, C.D., Tipton, P.A., Blevins, D.G., Piedras, P., Pineda, M., Polacco, J.C., **2006**. Update on ureide degradation in legumes. *Journal of Experimental Botany* 57, 5–12. https://doi.org/10.1093/jxb/erj013

Tóth, B., Biljon, A. van, Moloi, M.J., Labuschagne, M., **2019**. Effects of different fertilization levels on the concentration of high molecular weight glutenin subunits of two spring, hard red bread wheat cultivars. *Cereal Chemistry* 96, 1004–1010. https://doi.org/10.1002/cche.10205

Toujani, W., Muñoz-Bertomeu, J., Flores-Tornero, M., Rosa-Téllez, S., Anoman, A.D., Alseekh, S., Fernie, A.R., Ros, R., **2013**. Functional Characterization of the Plastidial 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase Family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 163, 1164–1178. https://doi.org/10.1104/pp.113.226720

Tremblay, N., Wang, Z., Bélec, C., **2009**. Performance of Dualex in Spring Wheat for Crop Nitrogen Status Assessment, Yield Prediction and Estimation of Soil Nitrate Content. *Journal of Plant Nutrition* 33, 57–70. https://doi.org/10.1080/01904160903391081

Triboi, E., **2003**. Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *Journal of Experimental Botany* 54, 1731–1742. https://doi.org/10.1093/jxb/erg183

Triboi, E., Martre, P., Girousse, C., Ravel, C., Triboi-Blondel, A.-M., **2006**. Unravelling environmental and genetic relationships between grain yield and nitrogen concentration for wheat. *European Journal of Agronomy* 25, 108–118. https://doi.org/10.1016/j.eja.2006.04.004

Tsay, Y.-F., Chiu, C.-C., Tsai, C.-B., Ho, C.-H., Hsu, P.-K., **2007**. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* 581, 2290–2300. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.047

Tsay, Y.-F., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A., **1993**. The Herbicide Sensitivity Gene CM.1 of *Arabidopsis* Encodes a Nitrate-Inducible Nitrate Transporter. Cell 72, 705-713. https://doi.org.10.1016/0092-8674(93)90399-b

Tsouvaltzis, P., Kasampalis, D.S., Aktsoglou, D.-C., Barbayiannis, N., Siomos, A.S., **2020**. Effect of Reduced Nitrogen and Supplemented Amino Acids Nutrient Solution on the Nutritional Quality of Baby Green and Red Lettuce Grown in a Floating System. *Agronomy* 10, 922. https://doi.org/10.3390/agronomy10070922

U

Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A., Dubcovsky, J., **2006**. A NAC Gene Regulating Senescence Improves Grain Protein, Zinc, and Iron Content in Wheat. *Science* 314, 1298–1301. https://doi.org/10.1126/science.1133649

Upreti, D., Huang, W., Kong, W., Pascucci, S., Pignatti, S., Zhou, X., Ye, H., Casa, R., **2019**. A Comparison of Hybrid Machine Learning Algorithms for the Retrieval of Wheat Biophysical Variables from Sentinel-2. *Remote Sensing* 11, 481. https://doi.org/10.3390/rs11050481

V

van der Weerden, T.J., Luo, J., Di, H.J., Podolyan, A., Phillips, R.L., Saggar, S., de Klein, C.A.M., Cox, N., Ettema, P., Rys, G., **2016**. Nitrous oxide emissions from urea fertiliser and effluent with and without inhibitors applied to pasture. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 219, 58–70. https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.12.006

Vanoni, M.A., Curti, B., **2005**. Structure–function studies on the iron–sulfur flavoenzyme glutamate synthase: an unexpectedly complex self-regulated enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433, 193–211. https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.033

Vanoni, M.A., Dossena, L., Heuvel, R.H.H. van den, Curti, B., **2005**. Structure–function studies on the complex iron–sulfur flavoprotein glutamate synthase: the key enzyme of ammonia assimilation. *Photosynthesis Research* 83, 219–238. https://doi.org/10.1007/s11120-004-2438-z

Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Cai, N., Wong, J.H., Buchanan, B.B., Hurkman, W.J., **2005**. Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics* 5, 1594–1611. https://doi.org/10.1002/pmic.200401034

Verbauwhede, A.E., Lambrecht, M.A., Fierens, E., Shegay, O., Brijs, K., Delcour, J.A., **2019**. Impact of aqualysin 1 peptidase from *Thermus aquaticus* on molecular scale changes in the wheat gluten network during bread baking. *Food Chemistry* 295, 599–606. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.161

Verzeaux, J., Hirel, B., Dubois, F., Lea, P.J., Tétu, T., **2017**. Agricultural practices to improve nitrogen use efficiency through the use of arbuscular mycorrhizae: Basic and agronomic aspects. *Plant Science* 264, 48–56. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.08.004

Vilmus, I., Ecarnot, M., Verzelen, N., Roumet, P., 2014. Monitoring Nitrogen Leaf Resorption Kinetics by Near-Infrared Spectroscopy during Grain Filling in Durum Wheat in Different

Nitrogen Availability Conditions. *Crop Science* 54, 284–296. https://doi.org/10.2135/cropsci2013.02.0099

W

Wang, C., Lv, J., Coulter, J.A., Xie, J., Yu, J., Li, J., Zhang, J., Tang, C., Niu, T., Gan, Y., **2020**. Slow-Release Fertilizer Improves the Growth, Quality, and Nutrient Utilization of Wintering Chinese Chives (*Allium tuberosum Rottler* ex Spreng.). *Agronomy* 10, 381. https://doi.org/10.3390/agronomy10030381

Wang, K., Xu, F., Cao, S., Wang, H., Wei, Y., Shao, X., Zhou, W., Zheng, Y., **2019**. Effects of exogenous calcium chloride ($CaCl_2$) and ascorbic acid (AsA) on the γ-aminobutyric acid (GABA) metabolism in shredded carrots. *Postharvest Biology and Technology* 152, 111–117. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.03.005

Wang, P., Wang, Z., Cai, R., Li, Y., Chen, X., Yin, Y., **2011**. Physiological and Molecular Response of Wheat Roots to Nitrate Supply in Seedling Stage. *Agricultural Sciences in China* 10, 695–704. https://doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60052-7

Wang, S., Tian, X., Liu, Q., **2020**. The Effectiveness of Foliar Applications of Zinc and Biostimulants to Increase Zinc Concentration and Bioavailability of Wheat Grain. *Agronomy* 10, 178. https://doi.org/10.3390/agronomy10020178

Wang, W.-H., Köhler, B., Cao, F.-Q., Liu, L.-H., **2008**. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science* 175, 467–477. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.018

Wang, X.T., Below, F.E., **1995**. Tillering, nutrient accumulation, and yield of winter wheat as influenced by nitrogen form. *Journal of Plant Nutrition* 18, 1177–1189. https://doi.org/10.1080/01904169509364971

Wang, Y., Li, M., Guan, Y., Li, L., Sun, F., Han, J., Chang, J., Chen, M., Yang, G., Wang, Yuesheng, He, G., **2019**. Effects of an Additional Cysteine Residue of Avenin-like b Protein by Site-Directed Mutagenesis on Dough Properties in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67, 8559–8572. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02814

Wang, Y.-F., Wang, J.-F., Xu, Z.-M., She, S.-H., Yang, J.-Q., Li, Q.-S., **2020**. L-Glutamic acid induced the colonization of high-efficiency nitrogen-fixing strain Ac63 (*Azotobacter chroococcum*) in roots of Amaranthus tricolor. *Plant Soil*. https://doi.org/10.1007/s11104-020-04531-2

Wang, Z.-Q., Yuan, Y.-Z., Ou, J.-Q., Lin, Q.-H., Zhang, C.-F., **2007**. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *Journal of Plant Physiology* 164, 695–701. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.05.001

Waters, B.M., Uauy, C., Dubcovsky, J., Grusak, M.A., **2009**. Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *Journal of Experimental Botany* 60, 4263–4274. https://doi.org/10.1093/jxb/erp257

Wen, D., Xu, H., He, M., Zhang, C., **2020**. Proteomic analysis of wheat seeds produced under different nitrogen levels before and after germination. *Food Chemistry* 127937. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127937

White, P.J., Broadley, M.R., **2005**. Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Science* 10, 586–593. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.10.001

Wickham, H., **2016**. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis, 2nd ed, Use R! *Springer International Publishing*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4

Wieser, H., **2007**. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* 24, 115–119. https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004

Wieser, H., Gutser, R., von Tucher, S., **2004**. Influence of sulphur fertilisation on quantities and proportions of gluten protein types in wheat flour. *Journal of Cereal Science* 40, 239–244. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.05.005

Witte, C.-P., **2005**. Identification of Three Urease Accessory Proteins That Are Required for Urease Activation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139, 1155–1162. https://doi.org/10.1104/pp.105.070292

Witte, C.-P., Isidore, E., Tiller, S.A., Davies, H.V., Taylor, M.A., **2001**. Functional characterisation of urease accessory protein G (ureG) from potato. *Plant Molecular Biology* 45,169-179.

World Health Organization, **2002**. The world health report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life. *WHO*. https://www.who.int/whr/2002/en/ (accessed 04.16.20).

Wrigley, C.W., Batey, I.L., **2012**. Assessing grain quality, in: Cauvain, S.P. (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. Woodhead Publishing, pp. 149–187. https://doi.org/10.1533/9780857095695.1.149

X

Xia, H., Xue, Yanfang, Liu, D., Kong, W., Xue, Yanhui, Tang, Y., Li, J., Li, D., Mei, P., **2018**. Rational Application of Fertilizer Nitrogen to Soil in Combination With Foliar Zn Spraying Improved Zn Nutritional Quality of Wheat Grains. *Frontiers in Plant Science* 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00677

Xiao, T., Boada, R., Marini, C., Llugany, M., Valiente, M., **2020**. Influence of a plant biostimulant on the uptake, distribution and speciation of Se in Se-enriched wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Pinzón). *Plant Soil*. https://doi.org/10.1007/s11104-020-04686-y

Xiao, Y., Chen, Y., Charnikhova, T., Mulder, P.P.J., Heijmans, J., Hoogenboom, A., Agalou, A., Michel, C., Morel, J.-B., Dreni, L., Kater, M.M., Bouwmeester, H., Wang, M., Zhu, Z., Ouwerkerk, P.B.F., **2014**. OsJAR1 is required for JA-regulated floret opening and anther dehiscence in rice. *Plant Molecular Biology* 86, 19–33. https://doi.org/10.1007/s11103-014-0212-y

Xu, G., Fan, X., Miller, A.J., **2012**. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 63, 153–182. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105532

Xu, L., Jiang, H., **2020**. Writing and Reading Histone H3 Lysine 9 Methylation in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00452

Xue, Y.-F., Xia, H.-Y., McGrath, S.P., Shewry, P.R., Zhao, F.-J., **2015**. Distribution of the stable isotopes 57Fe and 68Zn in grain tissues of various wheat lines differing in their phytate content. *Plant Soil* 396, 73–83. https://doi.org/10.1007/s11104-015-2582-6

Y

Yadav, R., Ror, P., Rathore, P., Ramakrishna, W., **2020**. Bacteria from native soil in combination with arbuscular mycorrhizal fungi augment wheat yield and biofortification. *Plant Physiology and Biochemistry*. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.039

Yakhin, O.I., Lubyanov, A.A., Yakhin, I.A., Brown, P.H., **2017**. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Frontiers in Plant Science* 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049

Yan, B.-F., Nguyen, C., Pokrovsky, O.S., Candaudap, F., Coriou, C., Bussière, S., Robert, T., Cornu, J.Y., **2018**. Contribution of remobilization to the loading of cadmium in durum wheat grains: impact of post-anthesis nitrogen supply. *Plant Soil* 424, 591–606. https://doi.org/10.1007/s11104-018-3560-6

Yan, S., Wu, Y., Fan, J., Zhang, F., Zheng, J., Qiang, S., Guo, J., Xiang, Y., Zou, H., Wu, L., **2020**. Dynamic change and accumulation of grain macronutrient (N, P and K) concentrations in winter wheat under different drip fertigation regimes. *Field Crops Research* 250, 107767. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2020.107767

Yang, B., Ma, J., Yao, X., Cao, W., Zhu, Y., **2021**. Estimation of Leaf Nitrogen Content in Wheat Based on Fusion of Spectral Features and Deep Features from Near Infrared Hyperspectral Imagery. *Sensors* 21, 613. https://doi.org/10.3390/s21020613

Yang, D., Luo, Y., Kong, X., Huang, C., Wang, Z., **2020**. Interactions Between Exogenous Cytokinin and Nitrogen Application Regulate Tiller Bud Growth via Sucrose and Nitrogen Allocation in Winter Wheat. *Journal of Plant Growth Regulation*. https://doi.org/10.1007/s00344-020-10106-3

Yang, H., Gu, X., Ding, M., Lu, W., Lu, D., **2019**. Activities of starch synthetic enzymes and contents of endogenous hormones in waxy maize grains subjected to post-silking water deficit. *Scientific Reports* 9, 7059. https://doi.org/10.1038/s41598-019-43484-0

Yang, H., Menz, J., Häussermann, I., Benz, M., Fujiwara, T., Ludewig, U., **2015**. High and Low Affinity Urea Root Uptake: Involvement of NIP5;1. *Plant and Cell Physiology* 56, 1588–1597. https://doi.org/10.1093/pcp/pcv067

Ye, D., Sun, L., Zou, B., Zhang, Q., Tan, W., Che, W., **2018**. Non-destructive prediction of protein content in wheat using NIRS. *Spectrochimica Acta* 189, 463–472. https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.08.055

Yin, L.-P., Li, P., Wen, B., Taylor, D., Berry, J.O., **2007**. Characterization and expression of a high-affinity nitrate system transporter gene (TaNRT2.1) from wheat roots, and its evolutionary relationship to other NTR2 genes. *Plant Science* 172, 621–631. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.11.014

Young, T.E., Gallie, D.R., **1999**. Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant Molecular Biology* 39, 915–926.

Yu, C., Lv, D.G., Qin, S.J., Yang, L., Ma, H.Y., Liu, G.C., **2010**. Changes in photosynthesis, fluorescence, and nitrogen metabolism of hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) in response to exogenous glutamic acid. *Photosynthetica* 48, 339–347. https://doi.org/10.1007/s11099-010-0044-1

Yu, Z., Juhasz, A., Islam, S., Diepeveen, D., Zhang, J., Wang, P., Ma, W., **2018**. Impact of mid-season sulphur deficiency on wheat nitrogen metabolism and biosynthesis of grain protein. *Scientific Reports* 8, 2499. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20935-8

Yuan, L., Graff, L., Loqué, D., Kojima, S., Tsuchiya, Y.N., Takahashi, H., von Wirén, N., **2009**. AtAMT1;4, a Pollen-Specific High-Affinity Ammonium Transporter of the Plasma Membrane in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 50, 13–25. https://doi.org/10.1093/pcp/pcn186

Yuan, L., Loque, D., Kojima, S., Rauch, S., Ishiyama, K., Inoue, E., Takahashi, H., von Wiren, N., **2007**. The Organization of High-Affinity Ammonium Uptake in *Arabidopsis* Roots Depends

on the Spatial Arrangement and Biochemical Properties of AMT1-Type Transporters. *The Plant Cell Online* 19, 2636–2652. https://doi.org/10.1105/tpc.107.052134

Yue, H., Jiang, D., Dai, T., Qin, X., Jing, Q., Cao, W., **2007**. Effect of nitrogen application rate on content of glutenin macropolymer and high molecular weight glutenin subunits in grains of two winter wheat cultivars. *Journal of Cereal Science* 45, 248–256. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.09.003

Z

Zanin, L., Venuti, S., Tomasi, N., Zamboni, A., De Brito Francisco, R.M., Varanini, Z., Pinton, R., **2016**. Short-Term Treatment with the Urease Inhibitor N-(n-Butyl) Thiophosphoric Triamide (NBPT) Alters Urea Assimilation and Modulates Transcriptional Profiles of Genes Involved in Primary and Secondary Metabolism in Maize Seedlings. *Frontiers in Plant Science* 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00845

Zecha, C.W., Link, J., Claupein, W., **2017**. Fluorescence and Reflectance Sensor Comparison in Winter Wheat. *Agriculture* 7, 78. https://doi.org/10.3390/agriculture7090078

Zecha, C.W., Peteinatos, G.G., Link, J., Claupein, W., **2018**. Utilisation of Ground and Airborne Optical Sensors for Nitrogen Level Identification and Yield Prediction in Wheat. *Agriculture* 8, 79. https://doi.org/10.3390/agriculture8060079

Zha, H.-G., Flowers, V.L., Yang, M., Chen, L.-Y., Sun, H., **2012**. Acidic α-galactosidase is the most abundant nectarin in floral nectar of common tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Annals of Botany* 109, 735–745. https://doi.org/10.1093/aob/mcr321

Zhang, B., Hua, Y., Wang, J., Huo, Y., Shimono, M., Day, B., Ma, Q., **2017**. TaADF4, an actin-depolymerizing factor from wheat, is required for resistance to the stripe rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. tritici. *The Plant Journal* 89, 1210–1224. https://doi.org/10.1111/tpj.13459

Zhang, J.-K., Zong, X.-F., Yu, G.-D., Li, J.-N., Zhang, W., **2006**. Relationship Between Phytohormones and Male Sterility in Thermo-Photo-Sensitive Genic Male Sterile (TGMS) Wheat. *Euphytica* 150, 241–248. https://doi.org/10.1007/s10681-006-9114-7

Zhang, M., Liu, H., Wang, Q., Liu, S., Zhang, Y., **2020**. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 5 gene from *Malus domestica* enhances oxidative stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 146, 269–277. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.031

Zhang, Y., Hu, X., Islam, S., She, M., Peng, Y., Yu, Z., Wylie, S., Juhasz, A., Dowla, M., Yang, R., Zhang, J., Wang, X., Dell, B., Chen, X., Nevo, E., Sun, D., Ma, W., **2018**. New insights into the evolution of wheat avenin-like proteins in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 13312–13317. https://doi.org/10.1073/pnas.1812855115

Zhang, Y., Pan, J., Huang, X., Guo, D., Lou, H., Hou, Z., Su, M., Liang, R., Xie, C., You, M., Li, B., **2017**. Differential effects of a post-anthesis heat stress on wheat (*Triticum aestivum* L.) grain proteome determined by iTRAQ. *Scientific Reports* 7, 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03860-0

Zhang, Yinghua, Zhang, Yongping, Liu, N., Su, D., Xue, Q., Stewart, B.A., Wang, Z., **2012**. Effect of source-sink manipulation on accumulation of micronutrients and protein in wheat grains. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175, 622–629. https://doi.org/10.1002/jpln.201100224

Zhao, C., Wang, Z., Wang, J., Huang, W., **2012**. Relationships of leaf nitrogen concentration and canopy nitrogen density with spectral features parameters and narrow-band spectral indices calculated from field winter wheat (*Triticum aestivum* L.) spectra. *International Journal of Remote Sensing* 33, 3472–3491. https://doi.org/10.1080/01431161.2011.604052

Zhao, D., Derkx, A.P., Liu, D.-C., Buchner, P., Hawkesford, M.J., **2015**. Overexpression of a NAC transcription factor delays leaf senescence and increases grain nitrogen concentration in wheat. *Plant Biology* 17, 904–913. https://doi.org/10.1111/plb.12296

Zhao, F.J., Su, Y.H., Dunham, S.J., Rakszegi, M., Bedo, Z., McGrath, S.P., Shewry, P.R., **2009**. Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin. *Journal of Cereal Science* 49, 290–295. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.11.007

Zhen, S., Deng, X., Li, M., Zhu, D., Yan, Y., **2018**. 2D-DIGE comparative proteomic analysis of developing wheat grains under high-nitrogen fertilization revealed key differentially accumulated proteins that promote storage protein and starch biosyntheses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410, 6219–6235. https://doi.org/10.1007/s00216-018-1230-4

Zhen, S., Zhou, J., Deng, X., Zhu, G., Cao, H., Wang, Z., Yan, Y., **2016**. Metabolite profiling of the response to high-nitrogen fertilizer during grain development of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science* 69, 85–94. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.02.014

Zheng, Y., Drechsler, N., Rausch, C., Kunze, R., **2016**. The *Arabidopsis* nitrate transporter NPF7.3/NRT1.5 is involved in lateral root development under potassium deprivation. *Plant Signaling & Behavior* 11, e1176819. https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1176819

Zhengping, W., Cleemput, O.V., **1996**. Movement of urea and its hydrolysis products as influenced by moisture content and urease inhibitors. *Biology and Fertility of Soils* 22, 101–108.

Zhou, H., Duan, H., Liu, Y., Sun, X., Zhao, J., Lin, H., **2019**. Patellin protein family functions in plant development and stress response. *Journal of Plant Physiology* 234–235, 94–97. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.01.012

Zhu, S., Liu, L., Xu, Y., Yang, Y., Shi, R., **2020**. Application of controlled release urea improved grain yield and nitrogen use efficiency: A meta-analysis. *PLOS ONE* 15, e0241481. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241481

Zörb, C., Becker, D., Hasler, M., Muehling, K.H., Gödde, V., Niehaus, K., Geilfus, C.M., **2013**. Silencing of the sulfur rich α-gliadin storage protein family in wheat grains (*Triticum aestivum* L.) causes no unintended side-effects on other metabolites. *Frontiers in Plant Science* 4. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00369

Zörb, C., Ludewig, U., Hawkesford, M.J., **2018**. Perspective on Wheat Yield and Quality with Reduced Nitrogen Supply. *Trends in Plant Science* 23, 1029–1037. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.08.012

Zörb, C., Steinfurth, D., Gödde, V., Niehaus, K., Mühling, K.H., **2012**. Metabolite profiling of wheat flag leaf and grains during grain filling phase as affected by sulfur fertilisation. *Functional Plant Biology* 39, 156–166. https://doi.org/10.1071/FP11158

Sites internet consultés

- Agence de l'eau, http://www.lesagencesdeleau.fr/

- Arvalis Institut du Végétal, https://www.arvalis-infos.fr/
- CITEPA, https://www.citepa.org/fr/
- FAOSTAT, http://www.fao.org/faostat/fr/
- FranceAgriMer, https://www.franceagrimer.fr/
- Unifa, https://www.unifa.fr/
- USDA, https://www.nass.usda.gov/

MAIGNAN Victor

Thèse de l'Université de Caen Normandie au sein de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (Spécialité : Sciences Agronomiques, Biotechnologies Agro-alimentaires). UMR INRAE-UCN 950 EVA (Écophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions NCS)

Titre : Evaluation des effets biostimulants de la Glutacétine® et de ses dérivés sur l'efficience d'usage de l'azote, le rendement et la qualité grainière du blé tendre : criblage en serre, validation au champ et développement d'outils de diagnostic

Résumé : La France est le premier producteur européen de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), une céréale majeure pour la filière semences et les secteurs agro-alimentaire et industriel. Cependant, il reste des marges d'amélioration du bilan agro-environnemental de cette culture céréalière vis-à-vis de ses besoins en azote (N) pour optimiser les rendements de manière durable et sans altérer la qualité de la farine conduisant par exemple à des intolérances au gluten. Dans ce contexte, ces travaux de thèse ont consisté (i) à étudier les effets d'un apport de formulations innovantes d'engrais azotés combinés à des biostimulants sur l'efficience d'usage de l'azote (EUA), le rendement et la qualité grainière (notamment le ionome et le protéome) sur le blé tendre en conditions contrôlées et de plein champ et (ii) à calibrer plusieurs outils de diagnostic (SPAD, XRF et NIRS) qui évaluent l'impact des biostimulants sur le statut nutritionnel de la culture et des traits de qualité de la graine.

Cette étude a mis en évidence l'effet bénéfique des biostimulants à base de Glutacétine® sur l'EUA, le rendement et ses composantes notamment le nombre de grains grâce à une meilleure fertilité des épis. L'optimisation de l'EUA a permis d'accroitre l'azote total dans les grains en serre et au champ notamment pour VNT4 et la Glutacétine®. La qualité grainière a aussi été fortement modifiée par les formulations testées notamment avec la baisse de la teneur en phytates, des changements au niveau du ionome (Mn, Mo, B et Se) et du protéome (protéines impliquées dans la régulation de la synthèse des protéines, la réponse aux stress biotiques et abiotiques, les fonctions de stockage et les processus de germination). D'un point de vue agro-économique, VNT4 et la Glutacétine® ont permis de générer des revenus complémentaires et sur le plan agro-environnemental, VNT4 a évité la fuite de 55 unités d'azote au champ. En parallèle, les calibrations d'outils de diagnostic portables utilisables au champ ont permis de déterminer les teneurs en éléments des feuilles (N), de la farine (N, P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn et Mn) et des pailles (P, K, Mg, S, Ca, Fe, Mn et Ni). Plus particulièrement, le développement de la technologie NIRS portable a permis d'établir les équations de prédiction du rendement, du PS, du PMG et de la teneur en N du grain à partir de spectres de réflectance obtenus sur les feuilles drapeaux au stade floraison.

Mots clés : Physiologie végétale, Blé tendre, Fertilisation Azotée, Biostimulant, Agronomie, Qualité du grain, Outil de diagnostic

Title: Evaluation of biostimulant effects of Glutacetine® and its derived formulations on nitrogen use efficiency, grain yield and quality of bread wheat: greenhouse screening, field validation and development of diagnostic tools

Abstract: France is the first European producer of bread wheat (*Triticum aestivum* L.), a major cereal for the seed, agro-food and industrial sectors. However, there is still a margin for improvement in the agro-environmental balance of this cereal crop with respect to its nitrogen (N) needs to optimize grain yield in a sustainable manner and without altering flour quality, leading to gluten intolerances for example. In this context, this thesis aimed (i) to study the effects of innovative formulations of N fertilizers combined with biostimulants on the N use efficiency (NUE), grain yield and quality (especially the ionome and the proteome) on bread wheat under controlled and field conditions and (ii) to calibrate several diagnostic tools (SPAD, XRF and NIRS) that evaluate the impact of biostimulants on the nutritional status of the crop and quality traits of the seed.

This study showed that biostimulants based on Glutacetine® promote NUE and improve grain yield and its components, especially grain number due to better fruiting efficiency. Optimization of NUE made it possible to increase total grain N under greenhouse and field conditions, especially for VNT4 and Glutacetine®. Grain quality was also greatly modified by the formulations tested, mainly with the decrease in the phytate content, changes in the ionome (Mn, Mo, B and Se) and the proteome (proteins involved in the regulation of protein synthesis, response to biotic and abiotic stresses, storage functions and germination processes). From an agroeconomic point of view, VNT4 and Glutacetine® generated additional income and from an agro-environmental perspective, VNT4 avoided the leakage of 55 kg N ha^{-1} under field conditions. In addition, the calibrations of portable diagnostic tools that can be used in the field made it possible to determine the element contents in leaves (N), flour (N, P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn and Mn) and straw (P, K, Mg, S, Ca, Fe, Mn and Ni). In particular, the development of portable NIRS technology allowed the establishment of the prediction equations of grain yield, specific weight, 1000 grain weight and N content in grain from reflectance spectra obtained on flag leaves at the flowering stage.

Key words: Plant physiology, Bread wheat, Nitrogen fertilization, Biostimulant, Agronomy, Grain quality, Diagnostic tool