



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions

Préparée au sein de « Université de Caen Normandie »

Identification d'indicateurs de la nutrition soufrée chez le colza (*Brassica napus* L.) : mécanismes physiologiques sous-jacents et validation en conditions de plein champ

Présentée et soutenue par
Elise SORIN

Thèse soutenue publiquement le 08 février 2016
devant le jury composé de

Monsieur Alain BOUCHEREAU	Professeur, Université de Rennes 1, Rennes	Rapporteur
Monsieur Tae-Hwan KIM	Professeur, Université Nationale de Chonnam, Gwangju, Corée du Sud	Rapporteur
Monsieur Christophe SALON	Directeur de recherche, INRA, Dijon	Examineur
Monsieur Xavier PINOCHET	Responsable département méthodes et technologies innovantes, Terres Inovia, Grignon	Examineur
Monsieur Jean-Claude YVIN	Directeur de recherche R&D, Centre Mondial d'Innovation, Saint-Malo	Examineur
Monsieur Alain OURRY	Professeur, Université de Caen Normandie, Caen	Directeur de thèse
Monsieur Philippe ETIENNE	Maître de Conférences HDR, Université de Caen Normandie, Caen	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Alain OURRY et Philippe ETIENNE, laboratoire Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments NCS (EVA)



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions

Préparée au sein de « Université de Caen Normandie »

Identification d'indicateurs de la nutrition soufrée chez le colza (*Brassica napus* L.) : mécanismes physiologiques sous-jacents et validation en conditions de plein champ

**Présentée et soutenue par
Elise SORIN**

**Thèse soutenue publiquement le 08 février 2016
devant le jury composé de**

Monsieur Alain BOUCHEREAU	Professeur, Université de Rennes 1, Rennes	Rapporteur
Monsieur Tae-Hwan KIM	Professeur, Université Nationale de Chonnam, Gwangju, Corée du Sud	Rapporteur
Monsieur Christophe SALON	Directeur de recherche, INRA, Dijon	Examineur
Monsieur Xavier PINOCHET	Responsable département méthodes et technologies innovantes, Terres Inovia, Grignon	Examineur
Monsieur Jean-Claude YVIN	Directeur de recherche R&D, Centre Mondial d'Innovation, Saint-Malo	Examineur
Monsieur Alain OURRY	Professeur, Université de Caen Normandie, Caen	Directeur de thèse
Monsieur Philippe ETIENNE	Maître de Conférences HDR, Université de Caen Normandie, Caen	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Alain OURRY et Philippe ETIENNE, laboratoire Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments NCS (EVA)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury. Je suis très honorée qu'Alain Bouchereau et Tae-Hwan Kim aient accepté de juger ce travail. Je remercie également Christophe Salon, Jean-Claude Yvin et Xavier Pinochet d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie Marie-Pascale Prud'homme et Philippe Laîné pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR EVA afin de réaliser ce travail de thèse. Merci pour votre gentillesse et pour l'esprit protecteur que vous avez envers tous les doctorants du laboratoire.

Un grand merci à mes directeurs de thèse, Alain Ourry et Philippe Etienne, de m'avoir encadré et conseillé durant toute la durée de cette thèse. Merci pour vos encouragements, votre patience et votre disponibilité. Malgré vos emplois du temps chargés, vous avez su m'accompagner et me soutenir jusqu'au bout des dernières pages de ce manuscrit. Merci pour toutes vos corrections et suggestions toujours pertinentes. Votre encadrement complémentaire m'a permis d'évoluer et de mener à bien ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier le Centre Mondial d'Innovation pour avoir financé cette thèse et d'avoir toujours rendu financièrement possible les expérimentations que je souhaitais réaliser. J'exprime mes remerciements à Jean-Claude Yvin et Florence Cruz pour m'avoir fait confiance pour réaliser ce sujet de thèse et pour l'attention que vous avez portée à mes travaux. Je tiens à remercier très sincèrement Mustapha Arkoun, merci pour tous tes conseils, ta gentillesse et pour tous ces échanges que nous avons pu avoir sur mon sujet de thèse. Merci à Xavier Sarda de m'avoir accompagné lors de ces petits tours de France des récoltes. Je remercie également Marion Randu, Frank Jamois, Angel-Mari Zamarreño et José-Maria Garcia-Mina qui ont contribué à mes travaux de recherche.

Je remercie tous les partenaires du projet SERAPIS pour les discussions constructives qui ont pu faire évoluer mon projet de thèse et pour tous les moments sympathiques passés lors des réunions de projet. Et merci particulièrement à Mustapha Arkoun, Karine Gallardo, Antoine Menil et Philippe d'Hooghe pour votre collaboration lors des expérimentations multi espèces.

Merci à l'école doctorale NBISE pour l'aide financière qui m'a permis de présenter mes travaux à un congrès international au Canada mais aussi pour les journées de l'école doctorale. Je garde un très bon souvenir de l'ensemble de ces journées. J'ai eu l'opportunité de participer à l'organisation de l'une d'entre elles, cela n'a pas toujours été simple mais j'en garde un souvenir très enrichissant et une soirée mémorable.

Mes remerciements vont à toutes les personnes du laboratoire EVA qui ont contribué de près ou de loin à mes travaux de thèse. Un grand merci à tous ceux qui ont participé aux multiples récoltes que ce soit au laboratoire ou au champ et vous êtes nombreux : Alain, Philippe, Sylvain, Anne, Thaïs, Josiane, Magali, Josette, Julie, Anne-Françoise, Frédérine, Marie-Paule, Marie-Laure, Bénédicte, Patrick, Sophie, Jean-Bernard, Jacques, Vincent, Marine, Alexandra, sans oublier la famille Ourry venue porter main forte un 28 décembre. J'en profite pour également remercier M. Chédeville et l'ensemble des agriculteurs qui ont rendu les expérimentations au champ possible.

Merci à Anne-Françoise pour ces innombrables litres de solution nutritive transportés et renouvelés lors des cultures en hydroponie. Merci à Magali et Josiane pour ces centaines et centaines de broyages et à Bénédicte pour le broyage de tous les échantillons volumineux. Merci à Josette pour toutes ces micropesées réalisées en un temps record, mais au-delà de ton aide technique indispensable, ton soutien moral fut aussi indispensable... Merci pour tous ces bons moments passés à rire et pour tous ceux passés à me réconforter, sans oublier tes coucous du matin, souvent accompagnés de petites gourmandises, qui m'ont beaucoup aidé à tenir sur la fin. Merci à Frédérine et Marie-Paule pour les dosages en IRMS. Merci également à Marie-Paule pour être toujours venue me secourir en HPLC. Merci à Julie pour m'avoir formé à la BM et pour ta bonne humeur qui ont fait de ces analyses un moment toujours sympathique. D'ailleurs, merci à toutes pour votre gentillesse et tous les bons moments passés à rire. Merci à Patrick pour les dépannages informatiques et les relevés en serre. Merci à Dominique pour ton aide technique et les nombreuses livraisons d'azote liquide. Merci à Sophie pour avoir réglé de divers problèmes administratifs.

Merci aussi à tous les chercheurs, Alain, Philippe, Sophie, Marie-Pascale, Servane, Annette, Jean Bernard, Emmanuelle, Frédéric, Jacques, Sylvain, Jean-Christophe, Philippe, pour toutes les discussions que l'on a pu avoir sur le soufre, sur ma thèse ou sur tant d'autres sujets divers et variés.

Et merci à tous pour les agréables moments de pause que ce soit au RU, en salle café ou sur la pelouse en été.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement les personnes avec qui j'ai partagé des moments inoubliables en congrès que ce soit à Athènes, Versailles, Freiburg ou Saskatoon. Merci à Anne, Thaïs, Marine, Alex, Philippe, Sophie, Frédéric, Jacques et Jean-Christophe pour tous ces souvenirs et d'avoir supporté le stress de mes présentations.

Un petit mot pour remercier mes stagiaires, Morgane, Vincent, Emmanuelle et Julie, que vos stages aient été plus ou moins long, votre aide aura été précieuse.

Je terminerai bien-sûr par vous les Docs, vous comptez parmi les personnes qui m'ont aidé à aller au bout de cette thèse. Merci pour tous ces moments partagés au labo mais aussi à l'extérieur avec ces inoubliables soirées. Merci aux anciens Docs que j'ai eu la chance de rencontrer. Philippe à peine je suis arrivée que tu es parti, mais nous avons quand même pu partager ce sympathique congrès en Grèce et cela a été un plaisir de te retrouver de l'autre côté en tant que partenaire SERAPIS. Vincent, merci pour toutes ces soirées « filles » partagées au cours de ta thèse et à l'occasion de tes visites à Caen. Alexandra, merci pour toutes ces grandes discussions que nous avons pu avoir mais aussi tous les délires. Caroline, cela ne fait pas longtemps que tu es partie et tu m'as déjà beaucoup manquée, surtout pendant ces derniers moments de rédaction, mais même à distance tu as su être présente et m'apporter tout ton soutien, merci ! A vous les Sérapinettes, Anne, Thaïs, nous avons tant partagé pendant ces trois années, je dirais même nous avons tout partagé. Merci pour ces moments passés à travailler ensemble mais surtout pour ces moments d'amitiés passés à rire, à pleurer et à se soutenir. Cette thèse n'aurait pas été la même sans vous. Je ne sais comment vous remercier par ces quelques mots pour que cela soit à la hauteur de ce que nous avons vécu. Aux Docs du bureau numéro 1, merci d'avoir supporté nos irruptions dans votre bureau. Marine, merci pour ces moments de folies, ces discussions sérieuses sur la thèse mais surtout pour ce souvenir mémorable du stop bar ! Elise, maintenant que tu entendas ton prénom tu pourras être sûre que c'est pour toi ! Aux petits nouveaux, qui finalement ne le sont pas

vraiment, Emilie, Cylia et Maxence, merci pour tous ces bons moments déjà passés ensemble. Et merci à Aurélia, qui fait bien entendu partie de la bande des Docs. Au final, merci les Docs, nous aurons partagé plus qu'une thèse, une belle amitié s'est formée au cours de ces trois années et j'espère qu'elle pourra continuer. Une fois que je serai partie, n'oubliez pas de faire des soirées (et si je suis encore par ici, de m'inviter !), et n'oubliez pas que c'est important de se changer les idées ! Bonne continuation à tous et bonne route pour la suite.

Un grand merci aux Rennais que j'ai toujours eu plaisir à retrouver lors de mes formations et manips sur le site du Rheu. Merci à Nathalie Nesi, Alain Bouchereau, Françoise Leprince, Sophie Rolland, Patrick Lecomte, Hélène Navier, Bernard Moulin et Clément Lavaud, pour votre accueil, votre aide et votre sympathie. J'en profite pour remercier tout particulièrement Alain pour m'avoir transmis le goût de la recherche, de m'avoir encouragé à faire une thèse et pour avoir toujours cru en moi. Sophie, Clément, merci pour votre soutien et pour tous ces bons moments passés que ce soit en stage de master 2, au cours des soirées pendant mes déplacements à rennes ou pendant ces petits weekends passés ensemble à Rennes ou à Caen.

Je voudrais aussi remercier tous mes amis, Alice, Rémi, Clément et toute la bande des Y39 pour vous être toujours intéressés à ma thèse, pour tous ces bons moments passés ensemble qui m'ont aidé à déconnecter mais surtout pour tout le soutien que vous m'avez apporté durant ces derniers moments de rédaction. J'adresse tout particulièrement mes remerciements à Lucie, merci pour ton soutien, ton aide et d'avoir été présente malgré la distance.

J'adresse mes derniers remerciements à toute ma famille. A mes parents, merci de m'avoir toujours poussé à faire les études que je voulais, à ne jamais abandonner et de croire en moi. A Claire, Frédéric et au petit Victor mais aussi à Basile et Clémence de m'avoir soutenu et encouragé et d'avoir compris mes absences ces derniers temps. A mes grands-parents, merci d'avoir essayé de comprendre ce que je faisais et de vous y être toujours intéressés. A Philippe et Jacqueline, merci d'avoir toujours suivi ce que je faisais et de m'y avoir encouragé. Et à Martine et Dominique d'avoir toujours compris mes absences durant ces trois dernières années. Merci à tous et rassurez-vous ces 10 années d'études sont terminées, voilà une nouvelle aventure qui commence !

Enfin, bien-sûr, un grand merci à Guillaume, d'avoir été toujours présent, d'avoir tout supporté, d'avoir partagé les meilleurs et les pires moments de ces trois années de thèse, je dirais même pendant ces 10 dernières années d'études, sans toi je ne serais pas allée au bout. Sache que tu portes à merveille le surnom que t'ont attribué les Serapinettes, Mister Perfect.

Liste des abréviations

- A -

AA : acides amines

AAs : total amino acids

AH : adénosylhomocystéinase

APK : APS kinase

APR : APS réductase

APS : adénosine 5'-phosphosulfate

ASY : Abnormal Shoot in Youth transporter

ATPase : adénosine-triphosphate ases

ATPS : ATP sulfurylase

- B -

BASF : Badische Anilin- & Soda-Fabrik

BBV : Bretagne Biotechnologie Végétale

- C -

CBL : cystathionine β -lyase

cdNA : acide désoxyribonucléique
complémentaire

CGS : cystathionine γ -synthase

CIFRE : Conventions Industrielles de
Formation par la Recherche en Entreprise

CIPAN : Culture Intermédiaire Piège à Nitrate

CITEPA : Centre Interprofessionnel
Technique d'Etudes de la Pollution
Atmosphérique

CLC : chloride Channel

CMI : Centre Mondial d'Innovation

COMIFER : Comité d'Etude et de

Développement de la Fertilisation Raisonnée

COS : sulfure de carbonyle

CRM : Certified Reference Material

Ct : threshold cycle

cv : cultivar

Cys : cystéine

Cyst : cystathionine

- D -

DMS : sulfure de diméthyle, dimethylsulfide

DMSP : dimethylsulfopropionate

DW : Dry Weight

- E -

EDTA : éthylène diamine tétra acétique

ESA : Ecole Supérieure d'Agriculture

EVA : Ecophysiologie Végétale, Agronomie &
nutritions N. C. S.

- F -

FUI : Fond Unique Inter-Ministériel

- G -

GEAPSI : Génétiques et Environnementaux
de l'Adaptation des Plantes à des Systèmes
de culture Innovants

GGT : γ -glutamyltransférase

Glc : glucose

Glu : glutamate

GOGAT : Glutamine oxoglutarate
aminotransferase

GS : glutamine synthétase

GSH : glutathion réduit

GSHS : glutathion synthétase

GST : glutathion S-transférase

GS-X : glutathion conjugué

γ-EC : γ-glutamylcystéine

γ-ECS : γ-EC synthétase

- H -

ha : hectare

Hcy : homocystéine

HI : acide iodhydrique

HKT : high affinity K⁺ transporter

HPLC : High Performance Liquid
Chromatography

HR ICP-MS : High Resolution Inductively
Coupled Plasma - Mass Spectrometry

- I -

IACR : Institute of Arable Crop Research

ICP-OES : Inductively Coupled Plasma -
Optical Emission Spectrometry

INRA : Institut National de Recherche
Agronomique

- K -

KO : Knock-Out

- L -

LCT : low-affinity cation transporter

LEVA : Légumineuses, Ecophysiologie
Végétale Agroécologique

- M -

M : masse atomique

Met : méthionine

Moco : Molybdenum cofactor

MOT : molybdenum transporter

Mpb : million de paires de bases

MRP : Multidrug Resistance-associated
Protein

MS : méthionine synthase

MYB : myeloblastosis

- N -

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
Phosphate

NR : Nitrate Réductase

NSC : non-selective cation channels

NSCs : total non-structural carbohydrates

Ntot : total nitrogen

- O -

OAD : Outil d'Aide à la Décision

OAs : total organic acids

OAS : O-acétylsérine

OAS-TL : O-acétylsérine thiol-lyase

OPH : O-phosphohomoserine

- P -

PAPS : 3'-phosphoadénosine-5'-
phosphosulfate

pH : potentiel Hydrogène

PSI : photosystème I

PSII : photosystème II

- Q -

q-PCR : quantitative polymerase chain reaction

q.ha⁻¹ : quintaux par hectare

- R -

R² : coefficient de corrélation

RNA : ribonucleic acid

R-OH : précurseur hydroxylé

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RT : Reverse Transcription

RuBisCO : Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase

- S -

SAH : S-adénosylhomocystéine

SAM : S-adénosylméthionine

SAMS : SAM synthétase

SAT : sérine transférase

SD : Supplemental Data

SE : Standard Error

Ser : sérine

SHST : Stylosanthes hamata sulfate transporter

SiR : sulfite réductase

SLAC : slow anion channel associated transporter

SLIM1 : Sulfur LIMitation 1

SMM : S-méthylméthionine

SOT : sulfotransférases

STAS : sulfate transporter and anti-sigma domain.

Stot : total sulfur

SULTR : sulfate transporter

- T -

THF : tétrahydrofurane

Thr : threonine

TS : thréonine synthase

- U -

UMR : Unité Mixte de Recherche

UNIFA : Union Nationale des Industries Françaises de la Fertilisation

USDA : United States Department of Agriculture

- W -

W : watt

- X -

X-CysGly : cystéinyglycine conjuguée

XRF : X-ray fluorescence

Table des matières

Remerciements	i
Liste des abréviations	iv
Table des matières	vii
Chapitre I Introduction générale	1
Chapitre II Synthèse bibliographique	6
I. Le colza, une plante exigeante en soufre	6
I.1. Production et débouchés de la culture de colza	6
I.2. Quelques caractéristiques de la culture de colza	7
I.2.1. Les différents types de colza	7
I.2.2. Le cycle de développement du colza	7
I.2.3. Le colza, une plante exigeante en fertilisation minérale	8
I.3. La nutrition soufrée chez le colza.....	8
I.3.1. Rôles et exigences en soufre	8
I.3.2. Les différentes formes de soufre disponibles dans l'environnement.....	10
I.3.3. La fertilisation soufrée du colza	11
II. Effets et conséquences d'une limitation en S chez les Brassicacées	13
II.1. Effet d'une limitation en S sur le métabolisme soufré	14
II.1.1. L'absorption et le transport du S dans la plante	14
II.1.2. L'assimilation du S dans la plante	16
II.1.3. La remobilisation du S dans la plante.....	19
II.2. Effets d'une limitation en S sur les interactions avec d'autres métabolismes .	20
II.2.1. Les métabolismes azoté et carboné.....	20
II.2.2. Les métabolismes du Molybdène et du Sélénium	21
II.3. Effets d'une limitation en S sur le rendement et la qualité des graines.....	22
III. Les indicateurs de la nutrition soufrée	23
III.1. Définitions : diagnostic, indicateurs et Outil d'Aide à la Décision	23
III.2. Les indicateurs de la nutrition soufrée déjà proposés.....	25
III.2.1. Les grilles de décision et d'évaluation.....	25

III.2.2.	La modélisation	26
III.2.3.	L'analyse de sol	27
III.2.4.	L'analyse de plantes	29
III.2.4.1.	Les indicateurs macroscopiques	29
–	Le diagnostic visuel.....	29
–	Les OAD optiques	30
III.2.4.2.	Les indicateurs biochimiques	31
–	L'échantillonnage pour l'analyse des tissus	31
–	Les indicateurs biochimiques et moléculaires potentiels	32
IV.	Objectifs et hypothèses de recherche.....	37

Chapitre III Effet d'une privation en soufre sur les composantes du potentiel osmotique et sur le métabolisme azoté dans les feuilles de colza : identification d'un nouvel indicateur précoce40

Préambule.....40

Abstract41

Key words41

Abbreviations.....41

I. Introduction..... 42

II. Materials and methods 43

II.1. Hydroponic experiments and applications of restricted S and Cl supply 43

II.2. Tissue sampling 43

II.3. Measurement and calculation of water content and osmotic potential..... 43

II.4. Anion and cation analysis..... 43

II.5. Amino acid, organic acid and non-structural carbohydrate analysis..... 44

II.6. Calculation of contribution of solutes to the osmotic potential..... 44

II.7. S, N and ¹⁵NO₃ analysis..... 44

II.8. *In vivo* NR activity in plants 44

II.9. RNA extraction 44

II.10. Reverse transcription and q-PCR analysis 44

II.11. Statistical analysis..... 45

III. Results..... 45

III.1. Growth and osmotic potential were affected by S deprivation 45

III.2. Changes in osmotic potential during S deprivation were due to a significant accumulation of mineral and organic solutes.....	45
III.3. Contribution to osmotic potential of Cl^- , NO_3^- and PO_4^{3-} in compensating for the disappearance of SO_4^{2-} during S deprivation.....	46
III.4. Nitrogen metabolism was affected after 13 days of S deprivation	49
III.5. Compared to S deprivation, Cl deprivation affected only mineral and organic solute contents.....	50
IV. Discussion.....	51
Acknowledgements.....	54
References	54

Chapitre IV Evaluation des effets d'une limitation en soufre chez le colza cultivé en conditions de plein champ, par des mesures simples des teneurs foliaires en soufre, chlore et phosphore56

Préambule.....56

Abstract58

Key words58

Abbreviations.....58

I. Introduction..... 59

II. Materials and Methods 62

II.1. Field experiments and plant sampling..... 62

II.1.1. Field experiment 1: study of different fertilization rates on an S deficient field . 62

II.1.2. Field experiment 2: study of 45 commercial crops before fertilization and flowering 63

II.1.3. Field experiment 3: study of 56 commercial crops after fertilization and flowering 63

II.2. Multispecies experiment under controlled conditions..... 64

II.3. SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Cl^- and NO_3^- analysis..... 64

II.4. S, P, Cl and N analysis..... 64

II.5. Statistical analysis..... 65

III. Results..... 65

III.1. Under field conditions, a decrease in the SO_4^{2-} content was compensated by an increase in the ($\text{Cl}^- + \text{NO}_3^- + \text{PO}_4^{3-}$) contents in oilseed rape leaves leading to an increase in the ($[\text{Cl}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{PO}_4^{3-}]$): $[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio..... 65

III.2. The $([Cl^-]+[NO_3^-]+[PO_4^{3-}]):[SO_4^{2-}]$ ratio can be used in other plant species to detect S deficiency under controlled conditions	66
III.3. The simplified $([Cl^-]+[P]):[S]$ ratio could be used for an easier and faster determination of S deficiency under field conditions.....	67
III.4. Determination of threshold values of the $([Cl^-]+[P]):[S]$ ratio and their use on independent fields	68
IV. Discussion.....	69
IV.1. The $([Cl^-]+[NO_3^-]+[PO_4^{3-}]):[SO_4^{2-}]$ ratio as an indicator of S nutrition under field conditions.....	70
IV.2. Using the $([Cl^-]+[P]):[S]$ ratio instead of the $([Cl^-]+[NO_3^-]+[PO_4^{3-}]):[SO_4^{2-}]$ ratio	71
IV.3. Putative thresholds of the $([Cl^-]+[P]):[S]$ ratio	71
V. Conclusions.....	72
Acknowledgements.....	73
Supplemental data	74

Chapitre V Le transport racinaire aspécifique de certains éléments minéraux permet l'identification d'indicateurs nutritionnels précoces : le cas du sulfate et du molybdate.....77

Préambule.....77

Abstract79

Key words79

Abbreviations.....79

I. Introduction..... 80

II. Materials and Methods 82

II.1. Hydroponic experiments and tissue sampling..... 82

II.2. Field experiments and plant sampling 83

II.2.1. Study of different fertilization rates on an S deficient field..... 83

II.2.2. Study of 45 commercial crops before fertilization and flowering 84

II.3. Multispecies experiment under controlled conditions..... 84

II.4. Element analysis by mass spectrometry..... 85

II.5. Reverse transcription (RT) and q-PCR analysis 85

II.6. Statistical analysis..... 86

III. Results..... 87

III.1. S deprivation reduced S, N, K, Ca, B and Na uptake but strongly increased Mo uptake.....	87
III.2. S deprivation strongly and immediately increased uptake of Mo without induction of molybdate transporter genes.....	87
III.3. In leaves of S-deprived plants, Mo and S contents changed in opposite ways	88
III.4. Under field conditions, lower S availability increased leaf Mo content and hence the [Mo]:[S] ratio.....	89
III.5. Test of genericity of the [Mo]:[S] ratio as S-deficiency indicator	90
IV. Discussion.....	91
IV.1. Perturbations of Mo homeostasis by non-specific transport of molybdate and sulfate.....	91
IV.2. A potential indicator derived from early molecular events.....	92
Acknowledgements.....	94
Supplemental data	95
Chapitre VI Discussion générale et perspectives	99
I. Discussion générale.....	99
I.1. L'étude cinétique de la réponse du colza à une privation en soufre permet de proposer deux nouveaux indicateurs indépendants et complémentaires de la nutrition soufrée	100
I.2. Mise en œuvre d'une méthode simple de mesure des indicateurs en conditions de plein champ	104
I.2.1. Echantillonnage et prélèvement des feuilles	104
I.2.2. Méthodes d'analyse requises.....	104
I.2.3. Interprétation des indicateurs et choix des valeurs seuils.....	106
I.3. Intérêts d'une utilisation conjointe des indicateurs de remobilisation et d'absorption	107
II. Perspectives de recherche et de développement	109
II.1. Perspectives de recherche au niveau fondamental.....	109
II.2. Perspectives de développement.....	111
Références bibliographiques	113

Chapitre I

Introduction générale



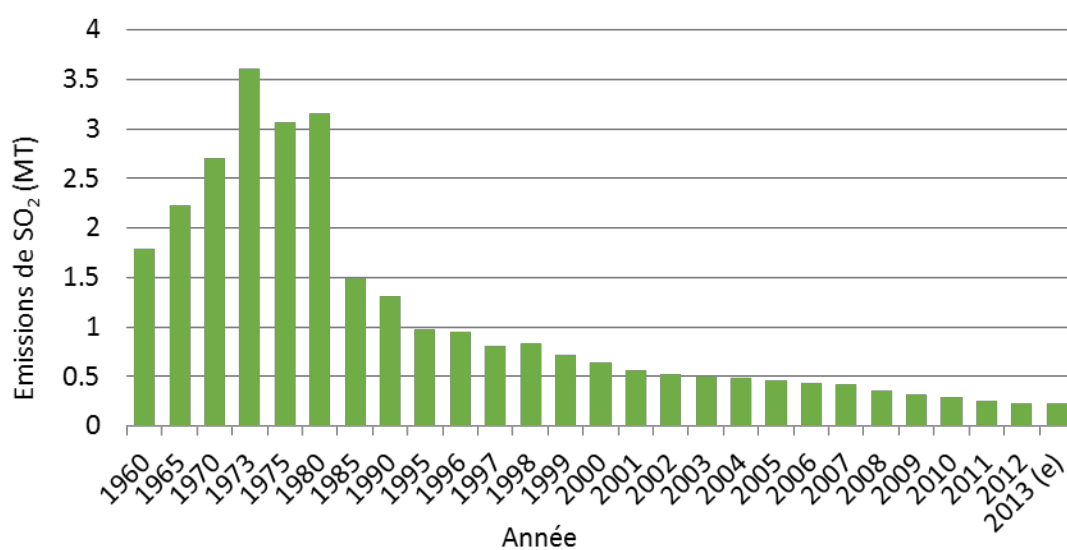


Figure I.1 Evolution des émissions de dioxyde de soufre (SO₂) dans l’atmosphère en France métropolitaine entre 1960 et 2013. (e) : estimation préliminaire. D’après CITEPA, 2013 (www.citepa.org).

Chapitre I

Introduction générale

Le soufre (S) est quantitativement le quatrième macronutriment issu du sol contribuant à l'élaboration de la biomasse végétale, après l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K). Le S intervient dans la composition de deux acides aminés protéinogènes (cystéine et méthionine) et donc de l'ensemble des protéines mais il est aussi impliqué dans la synthèse d'acides gras et de vitamines. Il est largement présent dans les protéines des graines et sa disponibilité peut impacter la qualité des produits récoltés (Dubousset *et al.*, 2010 ; D'Hooghe *et al.*, 2014 ; Brunel-Muguet *et al.*, 2015a). Les cultures doivent donc disposer d'un apport suffisant en S tout au long de leur cycle, pour optimiser la production et la qualité des produits récoltés.

Jusqu'au milieu des années 80, la disponibilité en S du sol n'était usuellement pas considérée comme limitante en raison des fortes retombées de S atmosphérique (sous forme de dioxyde de soufre (SO₂) impactant de plus le pH des pluies), principalement issus des activités industrielles utilisant des combustibles fossiles soufrés (charbon, lignite, fioul, gazole). La mise en place progressive de mesures environnementales (Convention sur la pollution atmosphérique transfrontière à longue distance de 1979 ainsi que les Protocoles d'Helsinki en 1987, d'Oslo en 1994, de Kyoto en 1997 et de Göteborg en 1999) ont permis de réduire considérablement les retombées atmosphériques de S d'origine anthropique et donc d'améliorer la qualité de l'air dans les pays industrialisés. En France, les émissions de SO₂ atmosphériques ont ainsi diminué de plus de 80 % entre 1980 et 2000 et sont en constante diminution depuis les années 2000 (CITEPA : Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique) (Figure I.1). Ainsi, on considère qu'actuellement, l'apport de S atmosphérique moyen en France, variable selon les régions, est inférieur à 10 kg de SO₃ (trioxyde de soufre ou anhydride sulfurique) par hectare et par an (UNIFA : Union Nationale des Industries Françaises de la Fertilisation).

Depuis plusieurs années, le contenu en S diminue aussi dans les engrais. Les pratiques culturales intensives actuelles entraînent l'utilisation, par les agriculteurs, d'engrais riches en azote ainsi que d'engrais phosphatés très concentrés du type ammonitrate ou superpotassique, qui ne contiennent quasiment pas de S. En France, le S apporté indirectement avec les engrais minéraux est passé d'environ 630 000 tonnes pour la campagne 1999-2000 (première campagne de mesure des livraisons de SO₃ dans les engrais) à près de 420 000 tonnes pour la campagne 2008-2009, soit une diminution de plus de 30 %. Pour la dernière campagne 2013-2014, la diminution d'apport de

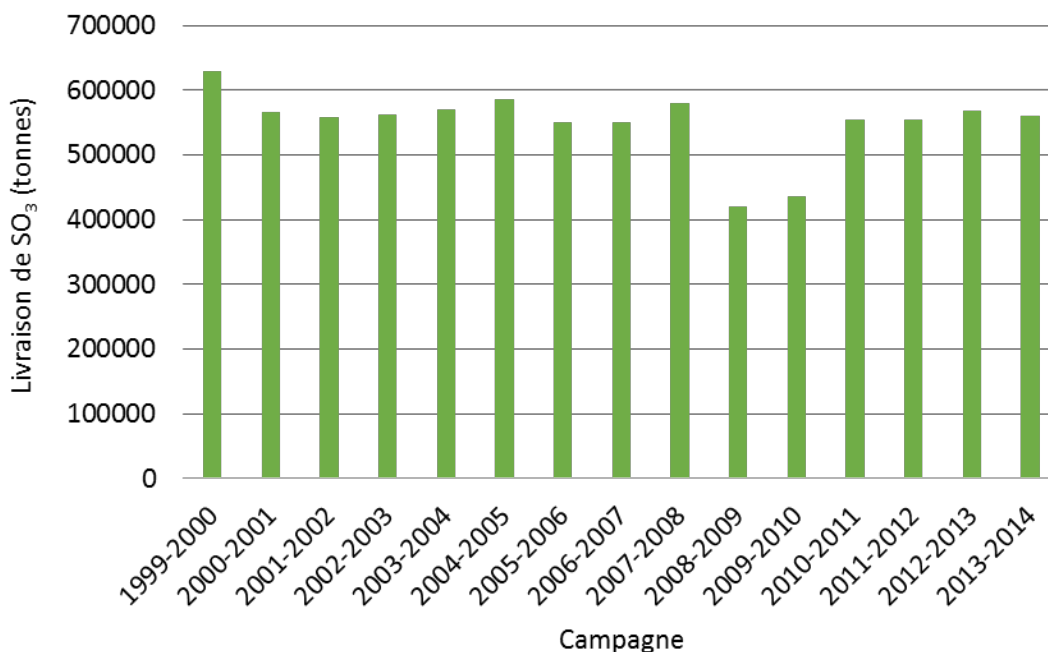


Figure I.2 Evolution des quantités de SO₃ contenues dans les engrais minéraux en France métropolitaine, de la campagne 1999-2000 à la campagne 2013-2014. D'après des données de l'UNIFA (<http://www.unifa.fr/le-marche-en-chiffres/la-fertilisation-en-france.html>).

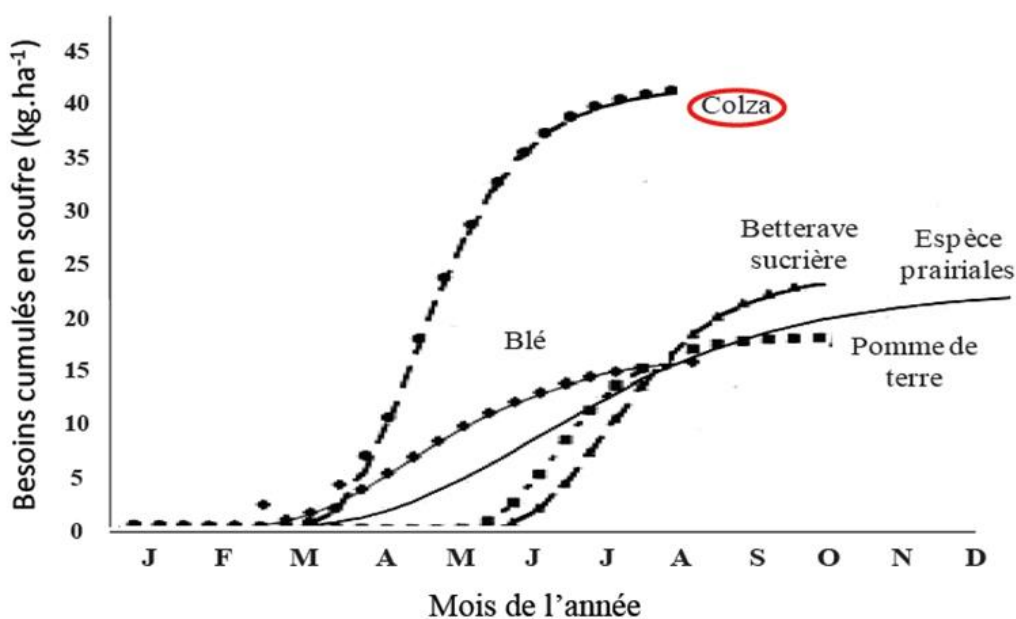


Figure I.3 Besoins annuels cumulés en soufre de différentes espèces végétales (colza, blé, betterave sucrière, espèces prairiales, pomme de terre) de janvier à décembre (Oenema et Postma, 2003).

S par les engrais minéraux est encore de 11 % inférieure à la première campagne de mesure (UNIFA) (Figure I.2).

La dépollution de l'air, associée à une faible utilisation des engrais soufrés et à un accroissement des rendements de génotypes plus performants, s'est traduite par un appauvrissement des sols en S conduisant à des carences sur de nombreuses cultures, comme le blé, le colza et les prairies. De plus, les végétaux constituent l'une des principales sources d'incorporation du S dans les chaînes trophiques. En effet, seuls les végétaux, champignons et bactéries sont capables d'absorber et d'assimiler du S minéral, contrairement aux animaux qui dépendent exclusivement du S d'origine organique (Komarnisky *et al.*, 2003).

D'un point de vue agronomique, une limitation en S se traduit par une diminution des rendements et de la qualité des produits récoltés. Parmi les espèces de grande culture, le colza est une des espèces présentant des besoins en S les plus importants, estimés à environ 45 kg de S par ha (soit 110 kg SO₃ ha⁻¹), alors que les céréales comme par exemple le blé, ont des besoins plus faibles allant de 15 à 25 kg de S par ha (Oenema et Postma, 2003) (Figure I.3). Du fait de ses forts besoins en S, le colza est une espèce particulièrement sensible à la limitation en cet élément. Une carence nutritionnelle en S peut provoquer des diminutions de rendement (Janzen et Bettany 1984 ; McGrath et Zhao, 1996 ; Malhi *et al.*, 2007) pouvant aller de 10 à 20 q.ha⁻¹ (Terres Inovia, 2011) et de la qualité des graines de colza par une altération de leurs teneurs protéique et lipidique ou encore une diminution de leur vigueur germinative (Dubousset *et al.*, 2010 ; D'Hooghe *et al.*, 2014 ; Brunel-Muguet *et al.*, 2015a). Une faible disponibilité en S réduit également les capacités d'absorption du N et l'efficacité d'utilisation de cet élément chez le colza (Schnug *et al.*, 1993 ; Fismes *et al.*, 2000 ; Dubousset *et al.*, 2010).

Afin de limiter les risques de carences nutritionnelles en S, de nombreux travaux ont cherché à développer des indicateurs de la nutrition soufrée permettant de diagnostiquer les phénomènes de déficience en S afin d'ajuster les doses d'intrants soufrés aux besoins réels de la culture (pour revue Blake-Kalff *et al.*, 2001). Mais à ce jour, il n'existe pas de méthode de diagnostic de la nutrition soufrée à la fois précoce, simple, utilisable en routine et en conditions de plein champ, qui permettrait de raisonner la fertilisation S. Il en résulte que les instituts techniques français tels que Terres Inovia (Ex CETIOM : Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains) recommandent un apport systématique d'engrais soufrés pour les plantes de grandes cultures, avec par exemple pour le colza, une préconisation d'un apport de 75 kg de SO₃ ha⁻¹ au début de la montaison. Ces recommandations, dites de sécurité, ne sont cependant pas raisonnées. Il s'agit de recommandations moyennes qui ne tiennent pas compte de la disponibilité du S du sol pour les plantes. Il peut potentiellement en résulter des conditions de sur-

fertilisation avec des conséquences environnementales et économiques potentielles, ou à l'inverse, des conditions de carence impactant la qualité et le rendement des cultures.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le projet SERAPIS financé par le Fond Unique Inter-Ministériel (FUI), projet labellisé par les pôles de compétitivité Végépolys et Valorial. Ce projet de recherche regroupe des partenaires du secteur privé (Centre Mondial d'Innovation (CMI) du Groupe Roullier de Saint-Malo, société Anaximandre de Landerneau, Végénov – BBV de Saint Pol de Léon, Unité de Recherche LEVA du Groupe ESA d'Angers) et du secteur public (UMR INRA-UCBN 950 EVA de l'Université de Caen, UMR INRA 1347 GEAPSI Agroécologie de Dijon). Les principaux objectifs de ce projet visaient à optimiser la nutrition soufrée des plantes cultivées en développant simultanément, des indicateurs de la fertilisation soufrée, des fertilisants innovants activateurs de la nutrition soufrée et des outils de pilotage en temps réel de la fertilisation, tout en contribuant à la préservation de l'environnement pour répondre aux exigences d'une agriculture raisonnée et durable.

Dans ce cadre, j'ai ainsi pu bénéficier d'une allocation CIFRE financée par le Centre Mondial d'Innovation du Groupe Roullier et d'une collaboration avec l'UMR INRA-UCBN 950 EVA se focalisant sur l'identification et le développement de nouveaux indicateurs de la nutrition soufrée du colza. Ce mémoire de thèse débute donc par une synthèse bibliographique traitant des conséquences d'une limitation en S chez le colza tant du point de vue agronomique, physiologique que moléculaire ainsi que sur les indicateurs de la nutrition soufrée déjà envisagés dans la littérature. Les méthodes de cultures et d'analyses ainsi que les résultats obtenus lors de mes expérimentations successives sont présentés au travers des trois articles suivants intitulés :

- « Effect of sulfur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: identification of a new early indicator ». Ce premier article, publié dans *Journal of Experimental Botany* en 2015, appréhende les modifications du potentiel osmotique foliaire induites par une privation en S chez le colza. Démontrant l'implication forte du sulfate dans le potentiel osmotique, les résultats suggèrent que sa remobilisation (et donc son assimilation) s'accompagne d'une accumulation d'autres anions comme le nitrate, le phosphate et le chlorure, qui permettent, au moins durant une phase précoce, un maintien du potentiel osmotique des feuilles lors d'une limitation en S. Ces résultats obtenus en conditions contrôlées suggèrent que le ratio $([Cl^-] + [NO_3^-] + [PO_4^{3-}] : [SO_4^{2-}])$ des feuilles puisse constituer un indicateur relativement précoce du statut de la nutrition soufrée chez le colza.

- « Assessment of sulfur deficiency under field conditions by single measurements of sulfur, chlorine and phosphorus in mature leaves ». Les résultats du premier article suggérant une

compensation osmotique de la remobilisation du sulfate foliaire par le nitrate, le phosphate et le chlorure, nous avons cherché à confirmer cette observation au sein d'un dispositif de culture de plein champ, puis à évaluer indirectement la concentration de ces anions par des mesures élémentaires (S, N, P, et chlore (Cl)). Un indicateur de nutrition dérivé de ces teneurs élémentaires est ensuite proposé et testé sur un plus grand nombre de parcelles de colza mais aussi chez d'autres espèces cultivées. Ce projet d'article sera probablement soumis à Plant and Soil, dès que les contraintes de confidentialité seront levées (dépôt de brevet en cours).

- « Non-specific root transport of nutrient gives access to an early nutritional indicator: the case of sulfate and molybdate ». Nos travaux antérieurs ont pu montrer, en accord avec les données de la littérature, que la première réponse du colza à une limitation S consiste à augmenter, de façon très précoce et massive, l'expression des gènes codant des transporteurs racinaires de sulfate. Ces transporteurs présentant aussi la particularité de transporter du molybdate, nous avons alors cherché à déterminer la pertinence d'un ratio [Mo]:[S] foliaire en tant qu'indicateur précoce du statut de nutrition soufrée chez le colza mais aussi chez d'autres espèces cultivées. Ces approches ont été conduites tant en conditions contrôlées que de plein champ, au moins en ce qui concerne le colza. Ce projet d'article sera probablement soumis à Journal of Experimental Botany, dès que les contraintes de confidentialité seront levées (dépôt de brevet en cours).

Ce manuscrit de thèse se termine par un dernier chapitre débutant par une discussion présentant une analyse globale des résultats obtenus et une comparaison des deux indicateurs de nutrition soufrée. Il s'achève par une présentation des perspectives de recherches tant appliquées que fondamentales qui découlent de ce travail doctoral.

Enfin, mes activités de recherche doctorale ont également fait l'objet de présentations orales lors des réunions semestrielles du projet SERAPIS mais aussi de deux communications orales lors de congrès internationaux :

- Elise Sorin, Anne Maillard, José-Maria Garcia-Mina, Angel-Mari Zamarreno, Mustapha Arkoun, Florence Cruz, Jean-Claude Yvin, Philippe Etienne, Alain Ourry (2013) Effect of S-limitation on osmotic potential components in oilseed rape leaves: towards the development of early indicators? 4th Sulphyton Workshop, 5–8 septembre 2013, Athènes, Grèce. Abstract book p18; Journal für Kulturpflanzen 66, März 2014, p102.

- Elise Sorin, Philippe Etienne, Anne Maillard, Angel-Mari Zamarreno, José-Maria Garcia-Mina, Mustapha Arkoun, Frank Jamois, Florence Cruz, Jean-Claude Yvin, Alain Ourry (2015) Effect of S deprivation on osmotic potential components and N metabolism in oilseed rape leaves:

identification of a new early indicator. 14th International Rapeseed Congress, 5-9 juillet 2015, Saskatoon, Canada. Abstract book p167.

Chapitre II

Synthèse bibliographique



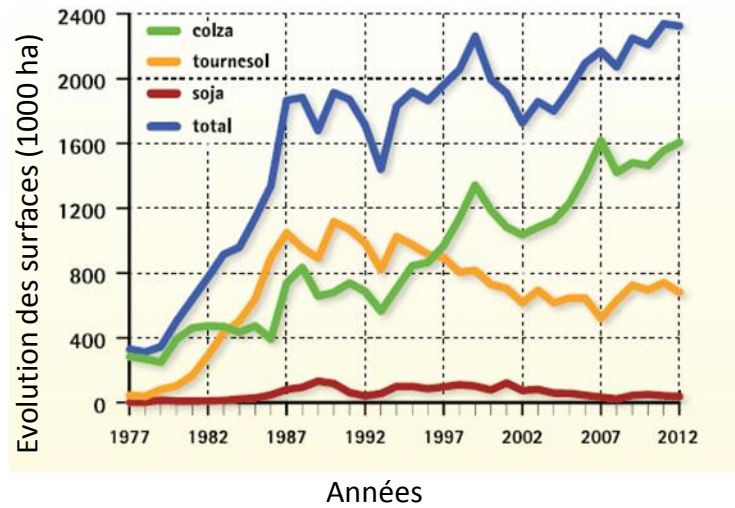


Figure II.1 Evolution des surfaces utilisées pour les principales cultures oléagineuses annuelles en France entre 1977 et 2012. D’après PROLEA, 2013 (www.prolea.com).

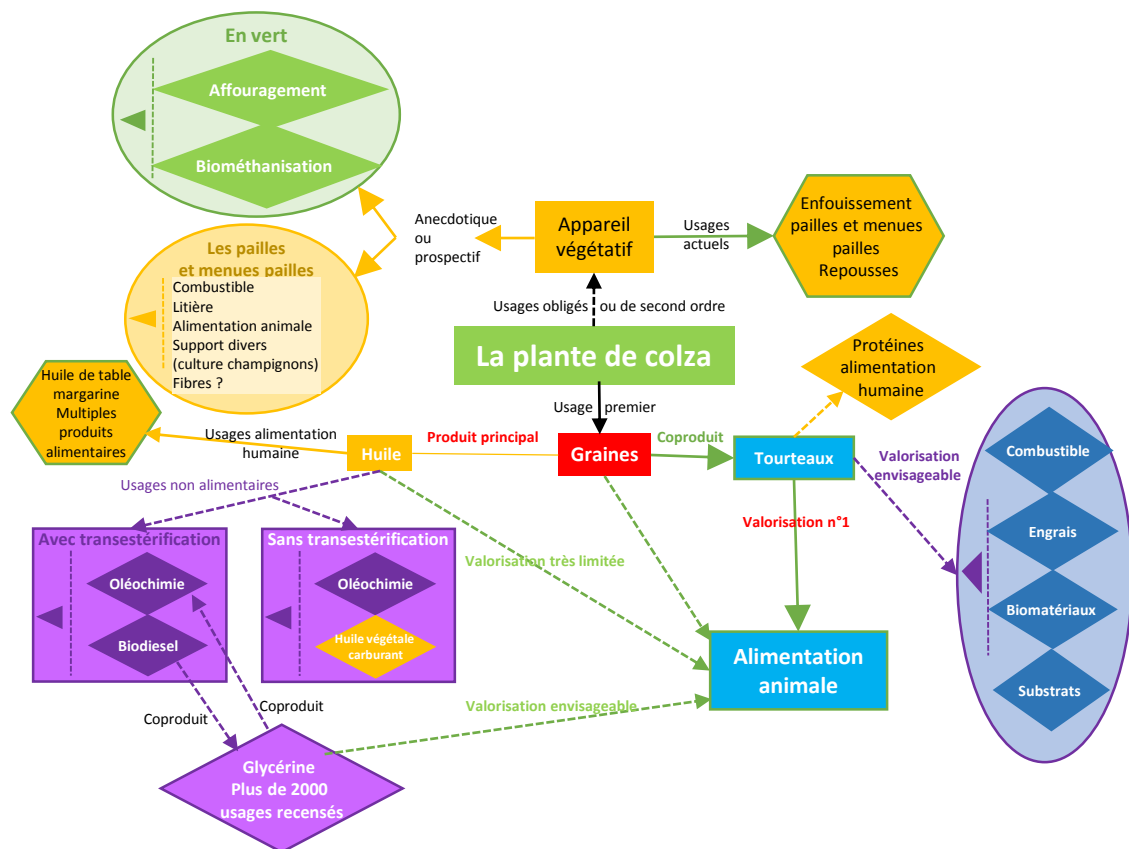


Figure II.2 Représentation schématique des valorisations existantes ou potentielles des cultures de colza (Hebinger, 2013).

Chapitre II

Synthèse bibliographique

I. Le colza, une plante exigeante en soufre

I.1. Production et débouchés de la culture de colza

Le colza est une culture largement répandue dans le monde, sa **production mondiale** a été estimée à 70,31 millions de tonnes pour 2014 pour une surface cultivée de 36,16 millions d'hectares (USDA : United States Department of Agriculture). Le colza occupe la deuxième place de la production mondiale des graines d'oléagineux, derrière le soja. Les principaux producteurs mondiaux de colza sont l'Union Européenne, la Chine, les Etats-Unis, le Canada et l'Inde. En France, la production du colza et donc ses surfaces d'exploitation sont en constante augmentation depuis les années 70. Elles atteignent près de 1,6 millions d'hectares en 2012, bien supérieures à celles des autres oléagineux à savoir le tournesol et le soja (PROLEA, 2013) (**Figure II.1**). En France, le rendement en graines du colza était estimé à 36,7 q.ha⁻¹ en 2014.

Les débouchés de la culture de colza sont multiples, allant de l'utilisation de l'appareil végétatif mais surtout à l'utilisation des graines et de ses produits de transformation (**Figure II.2**). La principale valorisation des graines de colza concerne la production d'huile, utilisée en alimentation humaine et reconnue pour sa composition lipidique (faible teneur en acides gras saturés, présence de plus de 60 % d'acide oléique, d'acides gras mono-insaturé et en moyenne de 30 % d'acides gras polyinsaturés, des oméga 3). L'huile de colza peut également être utilisée pour des usages non alimentaires comme par exemple pour la production de cosmétiques, de détergents ou de biodiesel (Dauguet *et al.*, 2013). Une partie des sous-produits est utilisée pour l'alimentation animale avec la production de tourteaux qui constitue une source intéressante de protéines, de minéraux et d'acides gras pour les animaux. La sélection variétale a permis la production de variétés dites double 00 et simple 0, faible en glucosinolate et/ou en acide érucique, dont la présence confère des effets néfastes voir toxiques à l'huile et une certaine inappétence au tourteau de colza pour les animaux (Haneklaus *et al.*, 2008).

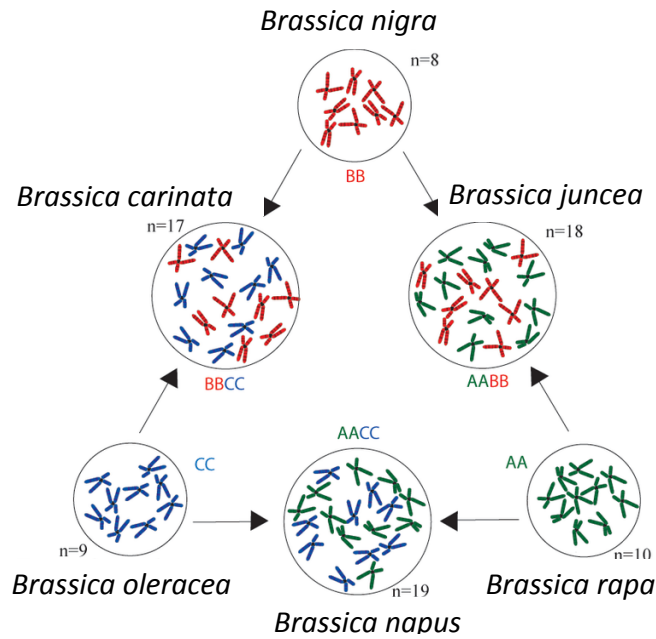


Figure II.3 Triangle de U présentant les relations génétiques entre les diverses espèces du genre *Brassica*. Les chromosomes de chacun des génomes A, B et C sont présentés par des couleurs différentes. (U, 1935).

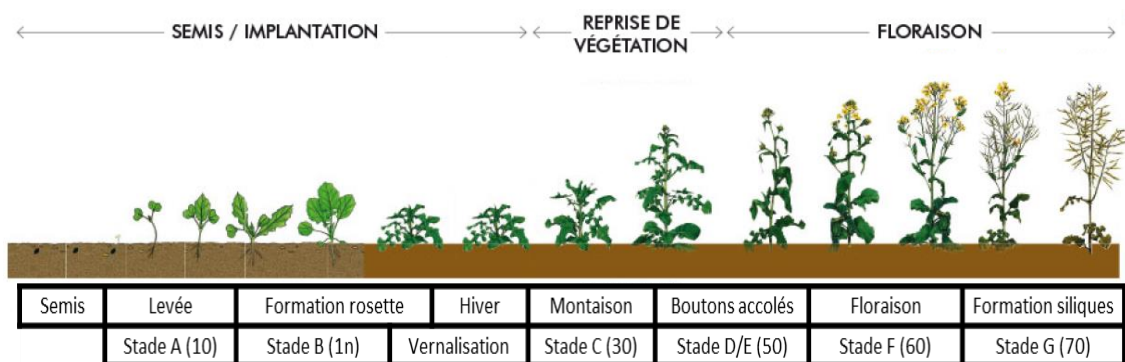


Figure II.4 Cycle simplifié du développement du colza d'hiver, du semis à la formation des graines, la nomenclature anglo-saxonne est indiquée entre parenthèses. D'après des données de Terres Inovia.

I.2. Quelques caractéristiques de la culture de colza

Le colza (*Brassica napus* L.) est une plante annuelle de la famille des **Brassicacées** (*Brassicaceae*), précédemment appelée famille des crucifères. Le colza, issu d'un croisement naturel entre deux espèces diploïdes que sont le chou (*Brassica oleracea* L.) et la navette (*Brassica campestris* L.) (U, 1935) (**Figure II.3**), est une espèce amphidiploïde, c'est-à-dire dotée d'un double génome.

I.2.1. Les différents types de colza

On distingue **trois types de colza** oléagineux : le colza d'hiver, le colza de type intermédiaire encore appelé colza semi-hiver et le colza de printemps, qui se différencient par leur période et leur durée de cycle cultural. Le colza de printemps est principalement cultivé en Amérique du Nord, en Australie et dans l'est et le nord de l'Europe. Son cycle de développement, entre mars et août, est court (120-150 jours) et ce type de colza ne nécessite pas de vernalisation pour fleurir. Le colza semi-hiver, plus particulièrement utilisé en Chine, est cultivé entre octobre et mai et fleurit en période de jours courts. Le **colza d'hiver** présente un cycle de développement plus long pouvant atteindre 330 jours, de fin août à début août, et nécessite une période de vernalisation pour entrer en floraison (Merrien et Pouzet, 1988). Il est le plus cultivé en Europe car il est plus adapté aux conditions climatiques de cette zone géographique et est particulièrement productif. Le colza est souvent utilisé comme Culture Intermédiaire Piège à Nitrate (CIPAN), du fait de sa grande capacité d'absorption et de stockage de l'azote. La culture du colza d'hiver présente également les avantages de participer à une meilleure structure du sol grâce à son système racinaire en pivot, et d'être un facteur de diversification des rotations où il contribue à la rupture du cycle des adventices et des maladies des céréales.

I.2.2. Le cycle de développement du colza

Le **cycle de développement** du colza d'hiver peut être décomposé en deux phases : une première phase de croissance végétative et une seconde phase reproductrice (**Figure II.4**). Le colza d'hiver est semé entre le 15 août et le 15 septembre. Après l'apparition des cotylédons, des feuilles pédonculées et découpées se forment et constituent la rosette. A ce stade, le colza d'hiver entre en vernalisation et peut supporter les faibles températures hivernales. Chez le colza d'hiver, cette période de froid est indispensable pour le passage de l'état végétatif au stade reproducteur, elle conditionne la montaison et l'initiation florale (Merrien et Pouzet, 1988). Après la période

hivernale, une reprise de croissance est observée, les feuilles nouvellement formées sont lancéolées et entières et la surface foliaire augmente jusqu'à la floraison. Au cours du stade reproducteur, les inflorescences se forment aux apex caulinaires et la tige se ramifie alors que la montaison et la floraison se poursuivent. Le colza est une plante autogame et la fécondation entraîne la formation de siliques au sein desquelles s'effectuent le développement, le remplissage et la maturation des graines. La récolte des graines s'effectue lorsque le taux d'humidité des graines est inférieur à 15 % et s'échelonne entre mi-juin et début août.

I.2.3. Le colza, une plante exigeante en fertilisation minérale

Au cours de son développement, le colza est une **culture exigeante en éléments nutritifs** avec des besoins particulièrement importants entre la reprise de végétation et l'entrée en floraison. Par comparaison avec les cultures céréalières, le colza présente des besoins nutritionnels élevés en N, P, K, S, Manganèse (Mn) et en bore (B). Le N est l'un des principaux facteurs qui conditionnent le rendement de la culture. En plus du N disponible dans le sol, le colza nécessite des apports d'engrais azotés importants, compris entre 160 et 250 kg.ha⁻¹ (Rathke *et al.*, 2005). Malgré une capacité d'absorption du nitrate particulièrement importante, le colza possède une faible efficacité d'utilisation du N (EUA ou NUE pour Nitrogen Use Efficiency). En effet, en raison d'une faible remobilisation foliaire des composés azotés, seulement 50 à 60 % de l'azote absorbé serait retrouvé dans les graines à la récolte (Schjoerring *et al.*, 1995). De plus, il existe une interaction forte entre les besoins de la plante en N et en S. Un apport de N stimule la croissance de la plante et donc le prélèvement de S (Zhao *et al.*, 1993 ; Kast *et al.*, 1995) mais en l'absence de disponibilité de ce dernier, l'apport de N va augmenter l'ampleur de la déficience en S. Il est donc d'une importance majeure de mieux gérer la fertilisation soufrée du colza, conjointement à la fertilisation azotée, afin de réduire les coûts économiques et les conséquences environnementales, tout en apportant les quantités requises de nutriments afin de maintenir la productivité de la culture.

I.3. La nutrition soufrée chez le colza

I.3.1. Rôles et exigences en soufre

Le S est indispensable à la croissance et au bon développement des plantes (Leustek *et al.*, 2000). En effet, le S intervient dans la composition d'acides aminés essentiels nécessaires à la synthèse des protéines mais aussi dans de nombreux autres composés. De façon non exhaustive, on retrouve le S dans deux acides aminés (la cystéine et la méthionine), des peptides (le glutathion

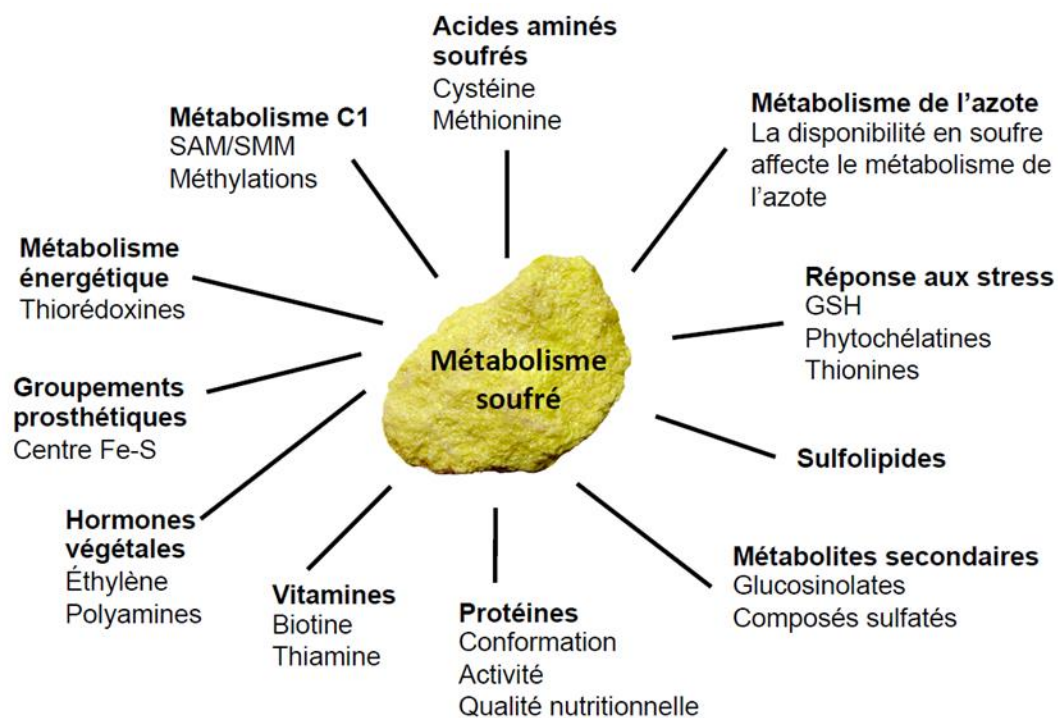


Figure II.5 Représentation schématique des fonctions physiologiques du S et de son implication dans la biosynthèse de divers métabolites végétaux. GSH : glutathion réduit, SAM : S- adénosylméthionine, SMM : S-méthylméthionine (Nikiforova *et al.*, 2004).

par exemple) et l'ensemble des protéines, des cofacteurs (la thiamine, le coenzyme A), des sulfolipides, des vitamines et au sein de composés secondaires tels que les glucosinolates et les phytochélatines (**Figure II.5**).

La **cystéine** joue un rôle central, elle est incorporée dans diverses protéines et elle est le précurseur de nombreux composés essentiels tels que la méthionine et le glutathion. Les ponts disulfures, que forment les groupements thiols des résidus de cystéine, jouent un rôle crucial dans la formation et la stabilisation de la conformation des protéines (Lewandowska et Sirko, 2008). Certaines protéines à ponts disulfures sont impliquées dans des voies clés du métabolisme de la plante, comme la photosynthèse, le cycle de Calvin, la synthèse d'amidon, l'assimilation du N et du S, la synthèse et la dégradation de protéines ou encore la réponse au stress oxydatif (Lindahl et Kieselbach, 2009). Le groupement thiol de la cystéine intervient dans la formation des centres fer-soufre des protéines. Par exemple, la ferrédoxine, protéine extrinsèque de la membrane thylakoïdienne, permet le transfert d'électrons vers le NADP lors de la photosynthèse et fournit également le pouvoir réducteur nécessaire au bon fonctionnement des enzymes impliquées dans la voie d'assimilation du nitrate et de l'ammonium telles que la nitrite réductase, la glutamine synthase ou encore la Glutamine oxoglutarate aminotransferase (GOGAT). Le **S-méthylcystéine sulfoxide (méthiine)** est un acide aminé dérivé de la cystéine dans la voie de biosynthèse du glutathion. Du fait de son omniprésence dans les différents organes du colza, de son accumulation dans les feuilles sénescents et de sa composition particulière (carbone (C), N, S), il interviendrait dans la remobilisation du soufre et de l'azote lors du développement végétatif et du remplissage des graines (Gaudin, 2013), de la même façon que la S-méthylmethionine chez le pois (Tan *et al.*, 2010).

La **méthionine** est un acide aminé soufré essentiel, initiateur de la synthèse des protéines et un acteur clé de nombreuses activités métaboliques. C'est un précurseur de la S- adénosylméthionine (SAM), impliquée dans des réactions de méthylation intervenant dans la synthèse des chlorophylles, des phospholipides, de certains acides gras. La méthionine intervient également dans la synthèse de polyamines et de l'éthylène (Hesse et Hoefgen, 2008). La **S-méthylméthionine (SMM)** est un dérivé de méthionine et est utilisée comme une des principales molécules de transport pour le S réduit dans la plante (Bourgis *et al.*, 1999).

Le S intervient dans de nombreuses autres molécules ayant des rôles essentiels dans la plante. Le **glutathion réduit (GSH)** intervient dans le maintien du statut redox de la plante par son action anti-oxydante, il protège les cellules des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui se produisent en réponse à différents stress (Foyer et Rennenberg, 2000 ; Mullineaux et Rausch, 2005). La **thiamine** et le **coenzyme-A** sont indispensables à l'activité de nombreuses enzymes

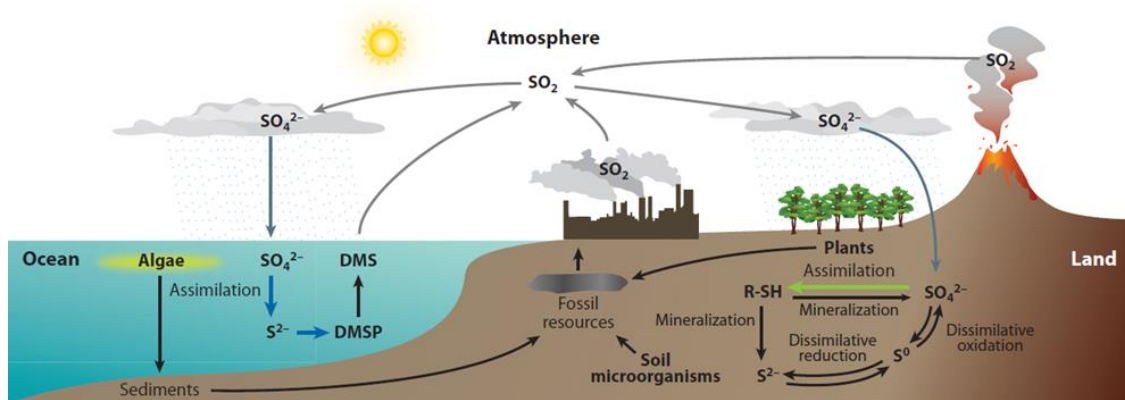


Figure II.6 Cycle biogéochimique du soufre. Le sulfate est assimilé par les plantes (flèche verte) et les algues (flèche bleue). Les microorganismes du sol utilisent le S dans les réactions dissimilatrices et minéralisent le S organique en sulfate. Le S peut être libéré dans l'atmosphère sous forme de composés volatils par les océans, les volcans et l'activité anthropique. Les composés soufrés volatils sont oxydés en sulfate dans l'atmosphère. DMS : dimethylsulfide, DMSP : dimethylsulfopropionate (Takahashi *et al.*, 2011).

(Takahashi *et al.*, 2011). Les **sulfolipides** localisés dans les membranes thylakoïdiennes interviennent dans les processus de la photosynthèse (Ahmad et Abdin, 2000b). Les **glucosinolates** jouent un rôle essentiel dans la défense de la plante contre les perturbations extérieures d'ordre biotique et abiotique (Lambrix *et al.*, 2001 ; Wittstock et Halkier, 2002 ; Rausch et Wachter, 2005). Les **phytochélatines** sont quant à elles impliquées dans les mécanismes de tolérance des plantes aux ions métalliques (Leustek et Saito, 1999).

Le colza est une plante particulièrement exigeante en S. Le colza est une des espèces qui présente les besoins en S les plus importants d'environ 45 kg de S par ha (soit 110 kg SO₃ ha⁻¹), par comparaison avec la culture de betteraves ou de céréales telles que le blé, qui a des besoins beaucoup plus faibles allant de 15 à 25 kg de S par ha (Oenema et Postma, 2003) (Figure I.3). La demande en S varie au cours du cycle de développement de la culture de colza, elle augmente fortement au moment de la reprise de végétation jusqu'à la formation des graines. Les besoins réels de la plante sont difficiles à déterminer, des exigences moyennes de 2,8 à 3,2 kg de S par quintal de graines produites ont été estimées selon le cultivar étudié (Studer *et al.*, 1987).

I.3.2. Les différentes formes de soufre disponibles dans l'environnement

Les plantes peuvent prélever le S dans l'atmosphère et le sol (Figure II.6). Les sources naturelles de S dans l'atmosphère sont sous différentes **formes gazeuses** telles que le dioxyde de S (SO₂, composé soufré majoritairement présent dans l'atmosphère), le dihydrogène de S (H₂S), le sulfure de carbone (COS) et le sulfure de diméthyle (DMS ou (CH₃)₂-S). Ces composés gazeux sont issus des éruptions volcaniques, des échanges gazeux avec l'océan, de la décomposition de la matière organique et des rejets industriels. Ils peuvent être prélevés par les plantes au niveau foliaire *via* une diffusion vers les stomates et à travers la cuticule (De Kok *et al.*, 2005). Ces prélèvements atmosphériques ne constituent qu'une très faible part des besoins en S chez les Brassicacées (Leustek et Saito, 1999). En France, l'apport actuel de S atmosphérique moyen est inférieur à 10 kg de SO₃ par ha et par an (UNIFA) ; on peut donc raisonnablement penser que l'acquisition de ce S atmosphérique par le colza reste mineure et que sa contribution diminuera à l'avenir.

Dans le sol, le soufre est **sous forme organique et minérale** et leurs teneurs sont affectées par des processus de mobilisation, minéralisation, immobilisation, oxydation et réduction. Généralement, plus de 95 % du S du sol est sous forme organique et n'est pas directement disponible pour la plante. Le S organique du sol se présente sous deux formes principales : directement lié au carbone (C-S, sulfonates et acides aminés soufrés) ou non directement lié au C,

comme les esters sulfate (C-O-S) et les sulfamates (C-N-S). Ce S organique n'est disponible pour les plantes qu'après intervention d'enzymes d'origine microbienne de la famille des sulfatases (Scherer, 2009). Dans les sols, le soufre minéral se rencontre sous tous ses niveaux potentiels d'oxydation du soufre élémentaire (S_0), allant du sulfure (S^{2-}), au thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$), au tétrathionate ($S_4O_6^{2-}$), au sulfite (SO_3^{2-}) et enfin au sulfate (SO_4^{2-}). La plante absorbe le S du sol au niveau racinaire principalement sous forme de SO_4^{2-} , qui est présent en faibles concentrations dans le sol et dont la teneur varie continuellement en fonction de l'équilibre entre l'absorption par les plantes, les apports d'engrais S, la minéralisation et l'immobilisation (McLaren et Cameron, 2004). De plus, le SO_4^{2-} étant un ion très mobile, les pertes par lixiviation peuvent atteindre jusqu'à 80 kg de S par ha et par an (Studer *et al.*, 1987).

Le S peut donc provenir de différentes sources naturelles comme les dépôts atmosphériques, la dégradation de la roche mère et la minéralisation de la matière organique du sol mais il peut également être apporté par les résidus de cultures, les eaux d'irrigation ou les produits antiparasitaires. Cependant, l'exportation importante de S par les végétaux cultivés combinée à la forte diminution des dépôts atmosphériques engendrent un épuisement progressif en S des sols (Scherer 2001). L'apport d'engrais soufré apparaît donc souvent indispensable pour répondre aux besoins des cultures lors des périodes clés de la croissance.

I.3.3. La fertilisation soufrée du colza

En préambule, il faut rappeler qu'en France, le mode officiel de comptabilisation du S des engrais est sous la forme de SO_3 , alors que c'est l'unité de S élémentaire qui est utilisée dans un cadre international (le coefficient de conversion de l'élément S en SO_3 est de 2,5). Une déficience en S peut être aisément corrigée par une application d'engrais soufré. Aux Etats-Unis, il est considéré qu'un apport d'environ 20 kg de S par ha est suffisant pour satisfaire les besoins en S du colza (Jackson, 2000). **Les recommandations** au Danemark et en Allemagne sont comprises entre 30 et 50 kg de S par ha pour éviter les effets d'une déficience en S modérée (Pedersen *et al.*, 1998). En France, l'institut technique Terres Inovia recommande un apport d'engrais soufrés de 75 kg de SO_3 par ha soit 30 kg de S. Une recommandation précise de la dose d'engrais S à appliquer selon les besoins réels de la plante reste difficile. Malgré ces recommandations, il a cependant été observé une grande variation des doses de S appliquées en condition de production, allant de 0 à 112 kg S ha⁻¹ (Sarda *et al.*, 2014).

Les engrais soufrés sont disponibles sous de nombreuses formes dont les plus communes sont le sulfate et le S élémentaire. Les engrais sous forme de sulfate sont facilement disponibles

Tableau II.1 Principaux engrais soufrés utilisés en France. D'après Terres Inovia, 2014 (www.terresinovia.fr).

Engrais	Concentration de SO ₃	Apport minimal en kg pour 75 unités de SO ₃ .ha ⁻¹ en kg	Élément associé au soufre
Sulfate d'ammoniaque	60 %	125	21 % N
Sulfonitrate d'ammoniaque 26	32,5 %	230	26 % N
Ammonitrate soufrée 26 13	13 %	580	26 % N
Solution azotée soufrée 26 14	11 %*	860	20,6 %* N
Superphosphate simple ou normal 18	30 %	250	18 % P ₂ O ₅
Superphosphate concentrée 25	20 %	375	25 % P ₂ O ₅
Sulfate de potassium	45 %	170	50 % K ₂ O
Kiesérite granulé (sulfate de magnésium)	50 %	150	25 % MgO
Engrais composés avec SO ₃ déclaré	variable	à calculer	

*Rapport masse/volume en %.

pour la plante mais le sulfate est très mobile dans le sol et peut être sujet au lessivage en cas de forte pluviométrie. Au contraire, le S élémentaire doit d'abord être oxydé en sulfate pour devenir disponible pour la plante. L'oxydation du S élémentaire est affectée par la présence de microorganismes capables de l'effectuer et par les caractéristiques du sol comme la température, le potentiel de l'eau et l'aération (Pedersen *et al.*, 1998 ; Zhao *et al.*, 2008). Les principaux engrais soufrés utilisables sont présentés dans la **Tableau II.1** (Pedersen *et al.*, 1998 ; Scherer, 2001 ; Zhao *et al.*, 2008 ; Grant *et al.*, 2012). Ils peuvent être apportés sous forme simple ou composée, associés à d'autres éléments. Les engrais contenant une haute teneur en S se présentent par exemple, sous la forme de sulfate d'ammoniaque, de sulfate de potassium ou de kiéresite. Le soufre peut également être apporté sous forme d'amendements souvent d'origine animale comme les fumiers et lisiers. Le S total du fumier organique est constitué de différentes formes de S : 20 % du S est sous forme de sulfide, 40 % est du S lié au carbone et les 40 % restant sont sous forme de S organique et inorganique (Eriksen *et al.*, 1994 ; Pedersen *et al.*, 1998).

La période d'apport d'une fertilisation soufrée est également un facteur important à prendre en compte car elle détermine l'effet que la fertilisation va avoir sur la culture. Les engrais sous forme de sulfate ne nécessitant pas d'oxydation, l'application peut se faire au début du printemps, quelques jours après la reprise de végétation (Mahli *et al.*, 2005 ; Grant *et al.*, 2012). Si l'apport est plus précoce, en automne, il y a des risques de perte par lixiviation et le S apporté ne sera pas disponible pour la culture (Riley *et al.*, 2002 ; Grant *et al.*, 2004 ; Mahli *et al.*, 2005). Et si l'apport d'engrais est tardif, il ne sera pas en adéquation avec le moment où les besoins en S sont élevés lors de la reprise de végétation. Concernant une fertilisation sous forme granulaire de S élémentaire, une application à l'automne permet une dispersion des particules de S et une oxydation pendant la période de croissance. Cependant, les applications automnales ont parfois montré qu'elles ne permettaient pas d'atteindre un rendement optimal du colza par comparaison avec les applications de printemps (Grant *et al.*, 2004 ; Malhi *et al.*, 2005).

Les apports de S sont rarement maîtrisés à l'heure actuelle car il n'existe pas de réelle recommandation basée sur les besoins de la culture elle-même. Ce manque de maîtrise de la fertilisation S peut entraîner des situations de sur-fertilisation avec des conséquences environnementales et économiques importantes mais aussi des situations de carence en S dont les nombreux effets sont décrits dans le paragraphe suivant.

+S

Alimentation suffisante en soufre

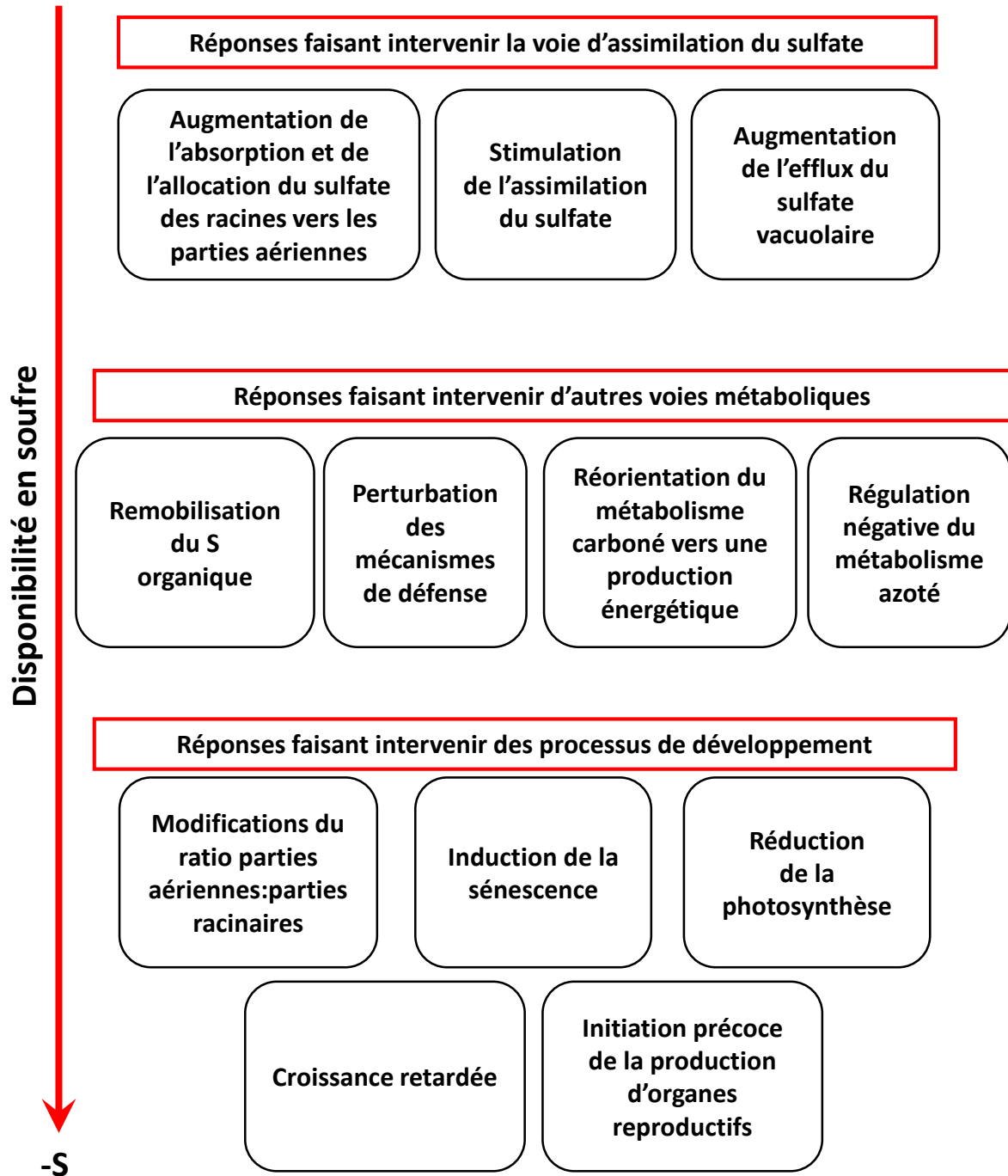


Figure II.7 Modèle de hiérarchisation des modifications physiologiques induite par une limitation en S chez les végétaux (Hawkesford et De kok, 2006 ; Hoefgen et Nikiforova, 2008 ; Lewandoswka et Sirko, 2008).

II. Effets et conséquences d'une limitation en S chez les Brassicacées

La compréhension des mécanismes physiologiques de réponse à une limitation en S a été réalisée en grande partie chez *Arabidopsis thaliana*, plante modèle de la famille des Brassicacées. Cette plante présente l'avantage d'avoir un petit génome (125 Mpb, $2n=10$) alors que le génome du colza est de grande taille (1130 Mpb, $2n=4x=38$). Toutefois, *A. thaliana* et *B. napus* présentant des différences au niveau morphologiques, physiologiques ou encore des besoins nutritionnels, les réponses de *B. napus* peuvent donc être différentes. Les données présentées dans cette partie ciblent donc essentiellement les connaissances obtenues chez les Brassicacées, quelques résultats obtenus chez d'autres végétaux peuvent néanmoins être présentés en complément.

Deux classes de limitation en soufre peuvent être distinguées (Schnug et Haneklaus, 1994) : (i) dans le cas d'une **faible limitation**, aussi appelée **déficience**, aucun symptôme visible n'est observé mais la croissance ainsi que le rendement et la qualité des grains peuvent être altérés, (ii) lors d'une **limitation sévère ou carence en S** des symptômes visuels et caractéristiques apparaissent au cours du cycle de culture avec des conséquences importantes sur la production en grains. Outre le niveau de disponibilité en S, la sévérité d'une limitation en S semble aussi dépendre du moment d'apparition et de la durée de la limitation en S au cours du cycle de développement de la plante (Haneklaus *et al.*, 2005 ; Dubousset *et al.*, 2010).

La réduction de la disponibilité en S provoque des changements métaboliques et moléculaires au sein de la plante. La perception d'une limitation en S par la plante fait intervenir une **cascade de réponses** qui peuvent être hiérarchisées en trois phases selon le degré et de la durée du déficit en S (Hawkesford et De Kok, 2006 ; Lewandowska et Sirko, 2008) (**Figure II.7**). Pendant la phase initiale, les changements concernent principalement la voie d'assimilation du S, comprenant l'absorption du sulfate et la remobilisation des réserves de sulfate des vacuoles (décrit dans le paragraphe II.1). Ces mécanismes d'absorption, de transport et d'assimilation du S sont régulés par le statut soufré de la plante (Saito, 2004). Après cette première phase, lorsque le S est toujours limitant, les changements impliquent alors de multiples voies métaboliques. Le métabolisme soufré étant une composante du métabolisme primaire des végétaux, il est en effet finement coordonné avec les métabolismes carboné et azoté (Kopriva et Rennenberg, 2004 ; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004b) (décrit dans le paragraphe II.2). La plante se réoriente alors vers une remobilisation des composés soufrés organiques et/ou vers une production d'énergie (Nikiforova *et al.*, 2005), initie les réactions de défense aux stress et régule négativement les gènes codant les transporteurs et les enzymes impliqués dans l'absorption et l'assimilation du N. Cette phase est suivie par des changements au niveau des processus de développement comme

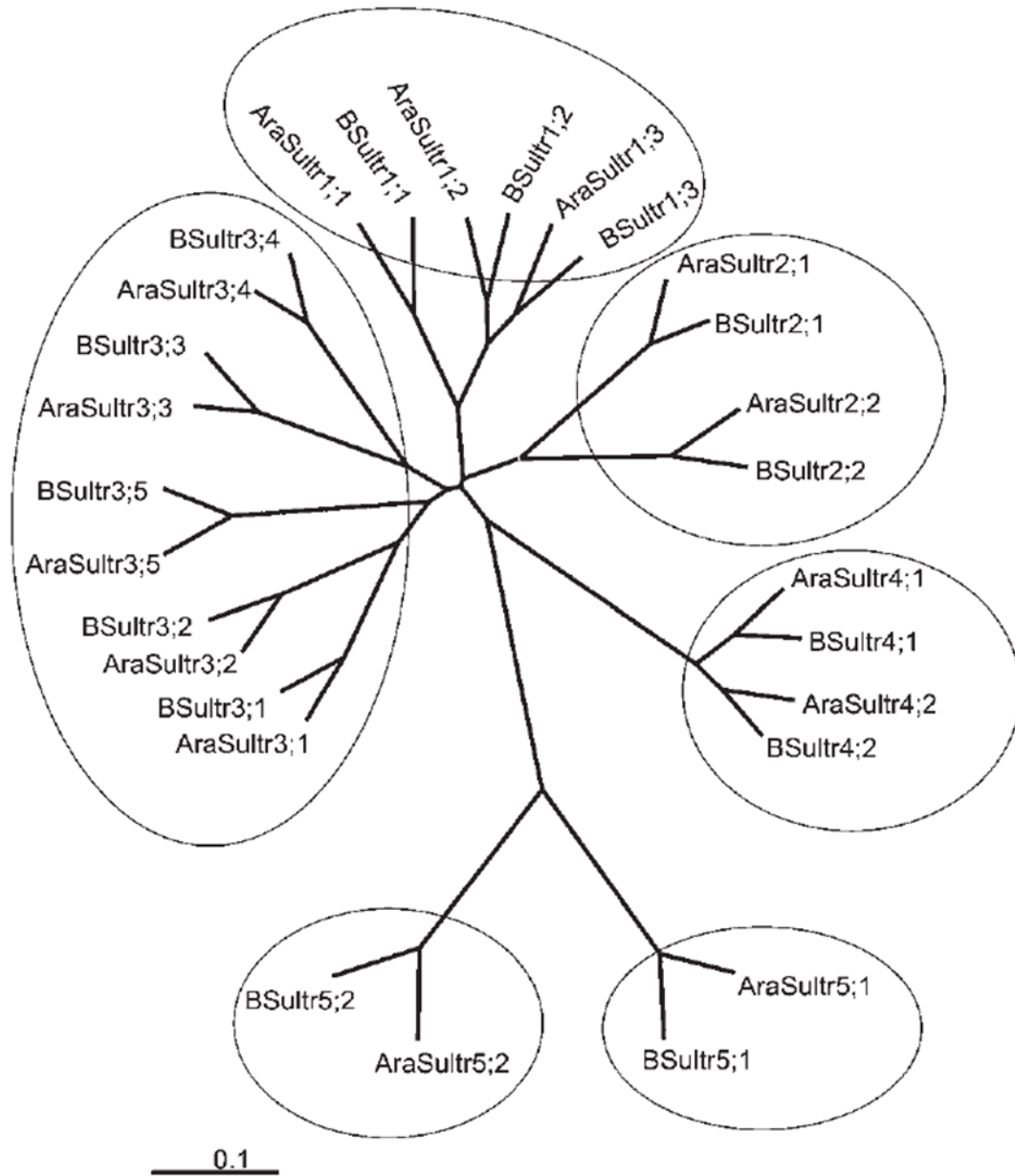


Figure II.8 Phylogénie des transporteurs de sulfate chez *A. thaliana* et *B. napus* (Parmar et al., 2007).

l'augmentation du rapport massique racines:parties aériennes, l'induction de la sénescence, la réduction de l'activité photosynthétique, la réduction de la croissance de la plante et l'initiation précoce du développement de l'appareil reproducteur pour diriger les ressources en S pour la production de graines.

II.1. Effet d'une limitation en S sur le métabolisme soufré

II.1.1. L'absorption et le transport du S dans la plante

Les plantes peuvent absorber du S atmosphérique au **niveau foliaire**. Le SO₂ et H₂S peuvent être prélevés sous forme de dépôts secs ou humides à travers la cuticule mais l'entrée de S par voie stomatique est la plus fréquente (De Kok *et al.*, 2005). Ces différents types de prélèvements foliaires ne constituent qu'une part mineure de l'absorption du S chez les Brassicacées (Leustek et Saito, 1999) et cette part est d'autant moins importante dans le contexte actuel de diminution des dépôts de S atmosphérique.

Le S est en effet majoritairement prélevé par les plantes au **niveau racinaire** sous forme de sulfate. Il peut être ensuite stocké dans les vacuoles ou éventuellement assimilé au niveau racinaire ou encore transporté vers les feuilles où il va être assimilé ou stocké sous forme de sulfate au niveau vacuolaire. L'absorption et le transport du sulfate au sein de la plante sont effectués par des **transporteurs de sulfate** au nombre de 14 chez *A. thaliana* et par extension chez *B. napus*. Les transporteurs de sulfate fonctionnent comme des symports (3 H⁺ pour 1 SO₄²⁻) et nécessitent un gradient de protons (H⁺) maintenus par une pompe H⁺/ATPase. Ils sont codés par une même famille de gènes et classés en cinq groupes fonctionnels selon les relations phylogéniques entre leurs séquences protéiques (Hawkesford 2003 ; Buchner *et al.*, 2004a,b ; Parmar *et al.*, 2007) (**Figure II.8**). De nombreuses études fonctionnelles, réalisées en particulier chez *A. thaliana*, ont mis en évidence des différences d'expression, de localisation, d'activité et donc de fonction entre les transporteurs des différents groupes. En réponse à une limitation en S, l'expression de nombreux transporteurs de SO₄²⁻ est modulée au niveau foliaire et racinaire chez *A. thaliana* (Rouached *et al.*, 2009) ainsi que chez *B. napus* (Parmar *et al.*, 2007).

L'absorption du S au niveau racinaire sous forme de sulfate s'effectue par un transport actif (Leustek et Saito, 1999 ; Hawkesford *et al.*, 1993) impliquant les transporteurs du **groupe 1 (SULTR1.1 et SULTR1.2)**. Ces transporteurs sont des transporteurs présentant une forte affinité

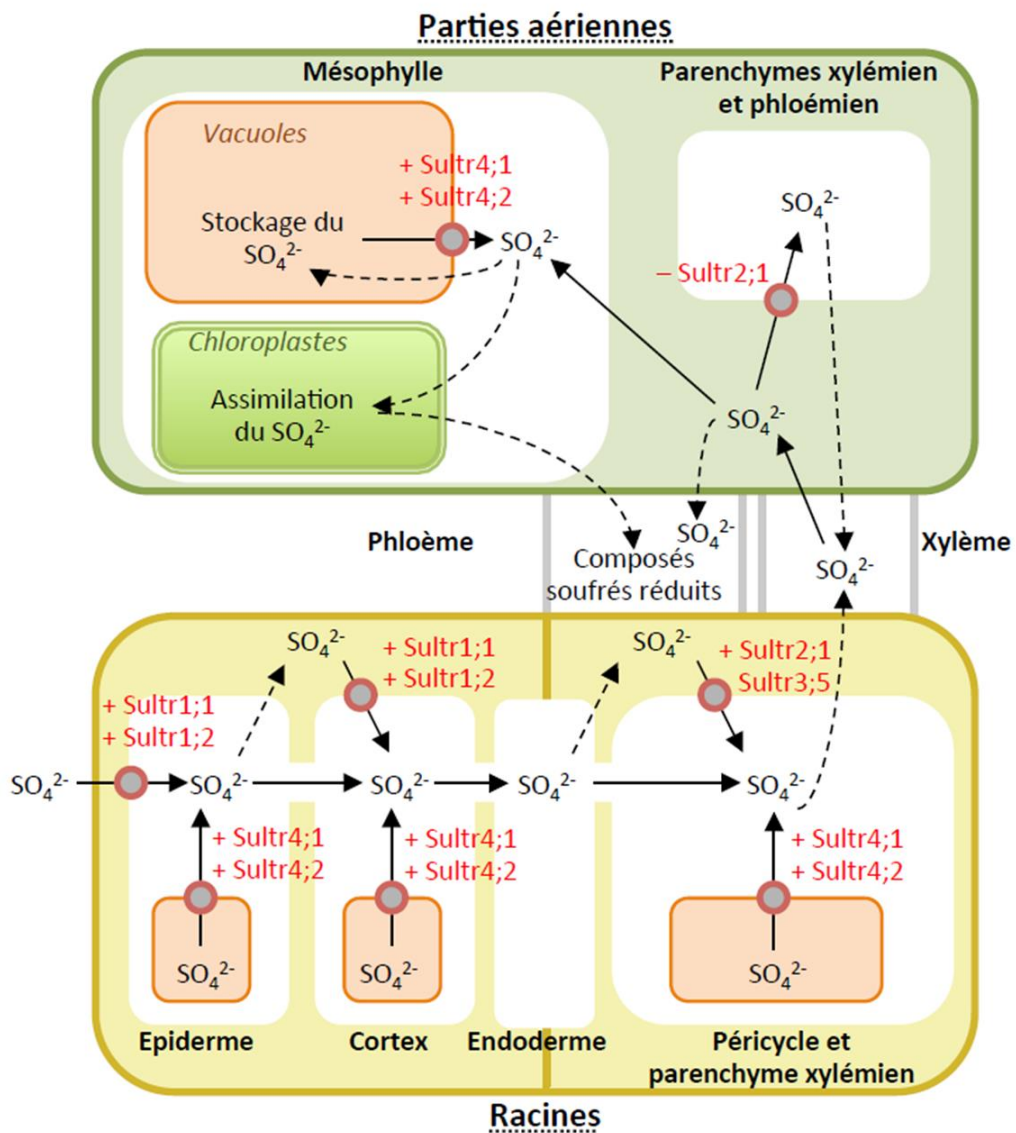


Figure II.9 Modifications de l'expression des transporteurs de sulfate au niveau racinaire et foliaire en réponse à une limitation en S chez *A. thaliana*. (+) : expression induite, (-) : expression réprimée (D'hooghe, 2013).

pour le sulfate et sont exprimés préférentiellement au niveau des poils absorbants et des cellules racinaires épidermiques et corticales chez *A. thaliana*. Lorsque le S est absorbé en quantité suffisante, l'expression des gènes *Sultr1.1* et *Sultr1.2* est réprimée (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004a). Au contraire, en réponse à une limitation en S, l'expression des gènes codant ces deux transporteurs est très largement augmentée (majoritairement celle de *Sultr1.1*) (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004b) et se traduit par une augmentation de la protéine correspondante (Yoshimoto *et al.*, 2007). Cette augmentation de l'expression de *Sultr1.1* et *Sultr1.2*, qui peut atteindre un facteur 300 chez des plantes déficientes en S par rapport à des plantes témoins (Abdallah *et al.*, 2010), permettrait une augmentation des capacités d'absorption du sulfate (Figure II.9).

Le transport du S entre les différents organes de la plante peut se faire par le phloème, sous forme de sulfate, par l'intermédiaire de différents transporteurs de sulfate (Hawkesford et de kok, 2006) mais également sous forme réduite de GSH (Foyer *et al.*, 2001), de méthionine (Balint et Rengel, 2011) et de SMM (Bourgis *et al.*, 1999). Le transporteur **SULTR1.3 du groupe 1**, présentant également une forte affinité pour le sulfate, est exprimé de façon spécifique dans les cellules compagnes du phloème et serait impliqué dans la distribution du S des organes sources vers les organes puits. En réponse à une limitation en S, l'expression du gène *Sultr1.3* est augmentée au niveau racinaire favorisant ainsi le transfert du S vers les parties aériennes (Yoshimoto *et al.*, 2003) (Figure II.9). Deux transporteurs du **groupe 2 (SULTR2.1 et SULTR2.2)**, à plus faible affinité pour le sulfate que les transporteurs du groupe 1, sont localisés au niveau des tissus conducteurs (Hawkesford, 2003). Le transporteur SULTR2.1 est exprimé au niveau racinaire dans les cellules du parenchyme xylémien et du péricycle, il interviendrait dans le transport du sulfate des racines vers les feuilles. Il est également exprimé au niveau foliaire dans les cellules du parenchyme du xylème et du phloème, où il permettrait le transport du sulfate entre l'apoplaste et les tissus conducteurs. Lors d'une limitation en S, l'expression du gène codant le transporteur *Sultr2.1* est augmentée au niveau racinaire favorisant ainsi le transfert du S vers les parties aériennes et réduite au niveau foliaire, ce qui limiterait la remobilisation du S des feuilles âgées vers les feuilles jeunes (Takahashi *et al.*, 2000). Le transporteur SULTR2.2 est quant à lui exprimé uniquement au niveau du phloème racinaire et semble être impliqué dans la réallocation du sulfate (Figure II.9).

Il existe trois autres groupes de transporteurs de sulfate : les transporteurs du groupe 3, du groupe 4 qui interviennent dans l'efflux du sulfate du tonoplaste (décrit dans le paragraphe II.1.3) et les transporteurs du groupe 5 (Figure II.8).

Les rôles des transporteurs du **groupe 3** dans le transport du sulfate n'ont pas encore été clairement démontrés. Le groupe 3 est constitué de 5 membres, dont la localisation de l'expression des gènes dépend de l'espèce étudiée et du stade de développement de la plante. Chez *A. thaliana*, SULTR3.1, SULTR3.2 et SULTR3.3 sont localisés au niveau foliaire (Takahashi *et al.*, 2000 ; Hawkesford *et al.*, 2003 ; Kataoka *et al.*, 2004a) alors que chez *B. oleracea*, SULTR3.2 est exclusivement exprimé au niveau racinaire et SULTR3.3 est exprimé à la fois dans les feuilles, les tiges et les racines (Buchner *et al.*, 2004a). Chez *B. oleracea*, SULTR3.4 et SULTR3.5 sont respectivement exprimés aux niveaux des tiges et des racines (Buchner *et al.*, 2004a). Contrairement aux transporteurs du groupe 1 et 2, l'expression des gènes codant les transporteurs du groupe 3 n'est pas modulée par la disponibilité en S.

Les transporteurs du **groupe 5** sont différents des autres transporteurs de sulfate des groupes précédemment présentés. Ils présentent une séquence protéique plus courte (environ 450 acides aminés contre approximativement 650 pour les autres groupes) et contrairement aux transporteurs de groupe 1 à 4, ils ne possèdent pas de domaine STAS (Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist) (Hawkesford, 2003) qui semble être impliqué dans l'activité et la régulation des transporteurs le possédant (Hawkesford, 2000 ; Rouached *et al.*, 2005). Chez *B. napus*, SULTR5.1 est présent au niveau du tonoplaste des racines, des tiges et des feuilles (Hawkesford *et al.*, 2003 ; Parmar *et al.*, 2007). Chez *A. thaliana*, SULTR5.1 a été identifié comme étant impliqué dans l'exportation de molybdate de la vacuole vers le cytosol, et a de ce fait été renommé MOT2 (molybdenum transporter 2) (Gasber *et al.*, 2011 ; Bittner, 2014). Par ailleurs, le transporteur SULTR5.2 a été identifié comme le premier transporteur de molybdate à haute affinité chez *Clamydomonas reinhardtii* (Tejada-Jimenez *et al.*, 2007) et *A. thaliana* (Tomatsu *et al.*, 2007 ; Baxter *et al.*, 2008 ; Bittner, 2014) et a été renommé MOT 1. Cependant, la localisation de MOT1 ainsi que son implication dans le transport du molybdate restent controversées, Tomatsu *et al.* (2007) ayant montré sa localisation, en partie dans la membrane plasmique et la membrane des vésicules voir dans le système endomembranaire, alors que Baxter *et al.* (2008) ont établi sa localisation dans les mitochondries.

II.1.2. L'assimilation du S dans la plante

Lors d'une **acquisition foliaire** du S atmosphérique, les composés gazeux peuvent être rapidement dissous dans l'apoplaste des feuilles et intégrés à la voie d'assimilation du sulfate par des mécanismes encore mal connus (De kok *et al.*, 2005). Chez *B. oleracea*, l'acquisition du H₂S est négligeable en conditions d'alimentation suffisante en sulfate mais elle peut permettre l'augmentation de S endogène dans le cas d'une limitation en sulfate (Buchner *et al.*, 2004a).

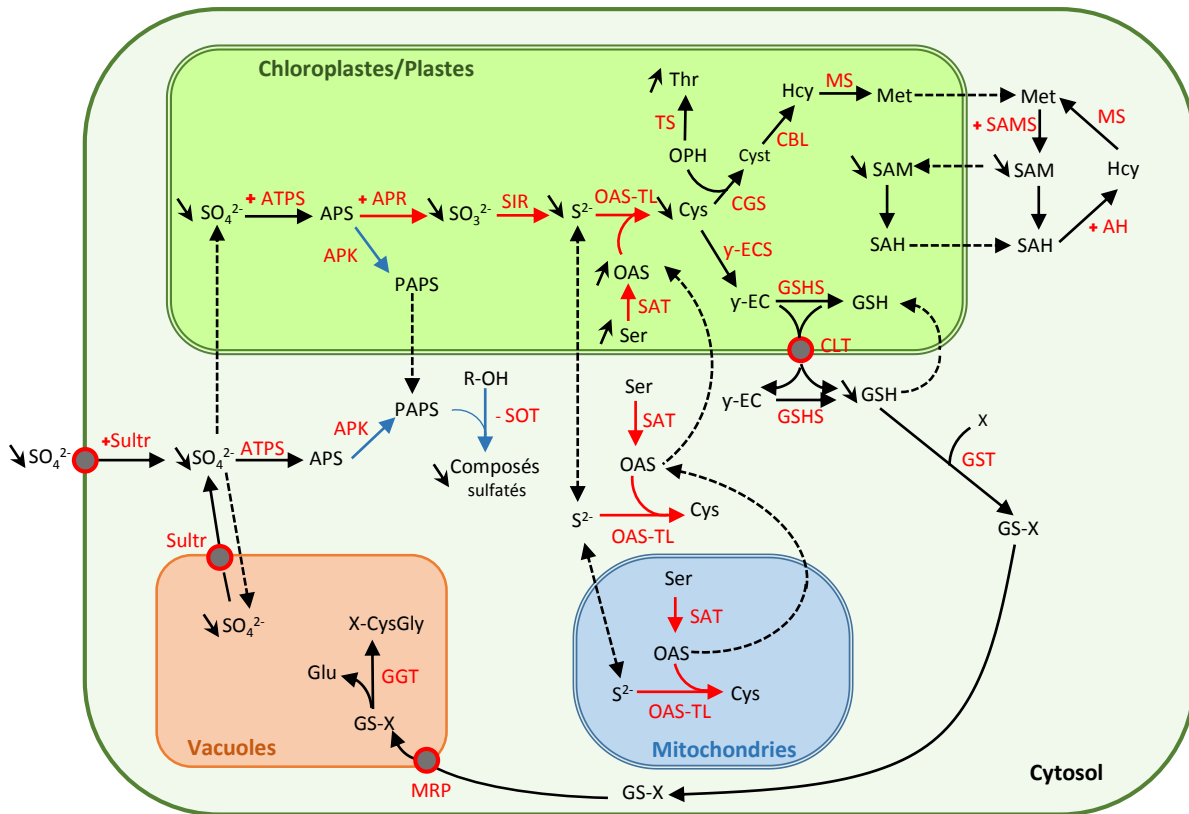


Figure II.10 Organisation cellulaire du métabolisme soufré chez les Brassicacées et régulation en réponse à une limitation en sulfate chez *A. thaliana*. Les ions et les métabolites sont indiqués en noir, les enzymes et les transporteurs en rouge. Les ronds rouges représentent les transporteurs permettant le transport de métabolites au travers d'une membrane. Les lignes pointillées indiquent des voies de transport putatives. La voie d'assimilation réductrice est indiquée par des flèches rouges et la voie d'assimilation non réductrice par des flèches bleues. Les signes + et - indiquent respectivement une régulation positive et négative de l'expression génique en réponse à une limitation en S. Abréviations métabolites : APS : adenosine 5'-phosphosulfate, Cys : cystéine, Cyst : cystathionine, Glu : glutamate, GSH : glutathion réduit, GS-X : glutathion conjugué, γ -EC : γ -glutamylcystéine, Hcy : homocystéine, Met : méthionine, OAS : O-acétylsérine, OPH : O-phosphohomosérine, PAPS : 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate, R-OH : précurseur hydroxylé, SAH : S-adénosylhomocystéine, SAM : S-adénosylmethionine, Ser : sérine, Thr : thréonine, X-CysGly : cystéinylglycine conjuguée. Abréviations enzymes et transporteurs : AH : adénosylhomocystéinase, APK : APS kinase, APR : APS réductase, ATPS : ATP sulfurylase, CBL : cystathionine β -lyase, CGS : cystathionine γ -synthase, CLT : transporteur de thiol, GGT : γ -glutamyltransférase, GSHS : glutathion synthétase, GST : glutathion S-transférase, γ -ECS : γ -EC synthétase, MRP : multidrug resistance-associated protein, MS : méthionine synthase, OAS-TL : OAS thiol-lyase, SAMS : SAM synthétase, SAT : sérine acétyltransférase, Sir : sulfite réductase, SOT : sulfotransférases, Sultr : transporteur de sulfate, TS : thréonine synthase (Nikiforova *et al.*, 2004, Takahashi *et al.*, 2011).

Lors d'une **absorption racinaire** du sulfate, et une fois transporté aux cellules foliaires, le sulfate qui n'est pas stocké au niveau vacuolaire, est directement activé en adénosine 5'-phosphosulfate (APS) par l'ATP sulfurylase (ATPS) dans le cytosol ou acheminé dans les plastes où il est également activé en APS par l'ATPS. A partir de l'APS, l'assimilation du sulfate peut s'effectuer selon deux voies métaboliques :

- **La voie d'assimilation non réductrice (Figure II.10)** : une part minoritaire de l'APS est phosphorylée en 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) par une APS kinase (APK), à la fois au niveau cytosolique et plastidial. Une réaction de sulfatation, entre le groupement sulfate du PAPS et un groupement hydroxyle libre d'une molécule organique, permet la synthèse des phytosulfokines et de glucosinolates chez les Brassicacées. Selon certains auteurs, en cas de restriction en sulfate chez *A. thaliana*, la dégradation des glucosinolates, potentiellement par une myrosinase putative, pourrait être une source endogène de S (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003 ; Hirai *et al.*, 2004). Néanmoins, cette voie d'assimilation non réductrice est mineure chez les végétaux, le sulfate est majoritairement intégré au métabolisme au niveau foliaire par la voie d'assimilation réductrice (Leustek et Saito, 1999).

- **La voie d'assimilation réductrice (Figure II.10)** : la part majoritaire de l'APS produite au niveau des plastes est réduite en sulfite (SO_3^{2-}) par une APS réductase (APR) qui est une enzyme clé de la voie d'assimilation réductrice (Kopriva et Koprivova, 2004). Une limitation en S entraîne une forte induction des niveaux d'expression de certains gènes codant l'APR et l'ATPS (Lappartient *et al.*, 1999 ; Koralewska *et al.*, 2009) entraînant ainsi une augmentation des activités de l'ATPS et de l'APR (Reuveny *et al.*, 1980). En effet, l'assimilation du sulfate est contrôlée par le statut soufré de la plante : étant réprimée sous condition d'alimentation suffisante en sulfate et stimulée en cas de limitation (Vauclare *et al.*, 2002 ; Kopriva et Koprivova, 2003). Généralement, il existe une bonne corrélation entre la régulation des niveaux d'expression des gènes codant les enzymes impliquées dans l'assimilation du sulfate et leurs activités. Toutefois, certaines protéines du métabolisme soufré sont également contrôlées de manière post-traductionnelle conférant à la plante la capacité de s'adapter rapidement aux variations de disponibilité en S (Droux *et al.*, 1998). C'est le cas du complexe cystéine synthase comprenant les enzymes sérine transférase (SAT) et O-acétylsérine thiol-lyase (OAS-TL). Les enzymes de ce complexe interviennent après la réduction du SO_3^{2-} en sulfide (S^{2-}) par une sulfite réductase (SiR). En condition d'alimentation S non limitante, une part du pool d'OAS-TL est recrutée au sein du complexe cystéine synthase, permettant l'activation de la SAT qui active ainsi la serine en OAS. Le S^{2-} est alors conjugué à l'OAS par l'intervention de l'OAS-TL libre et active (Droux *et al.*, 1998) formant ainsi la cystéine. Lors d'une limitation en S, une accumulation d'OAS se produit (Kim *et al.*, 1999 ; Kopriva et Rennenberg, 2004 ; Nikiforova *et al.*,

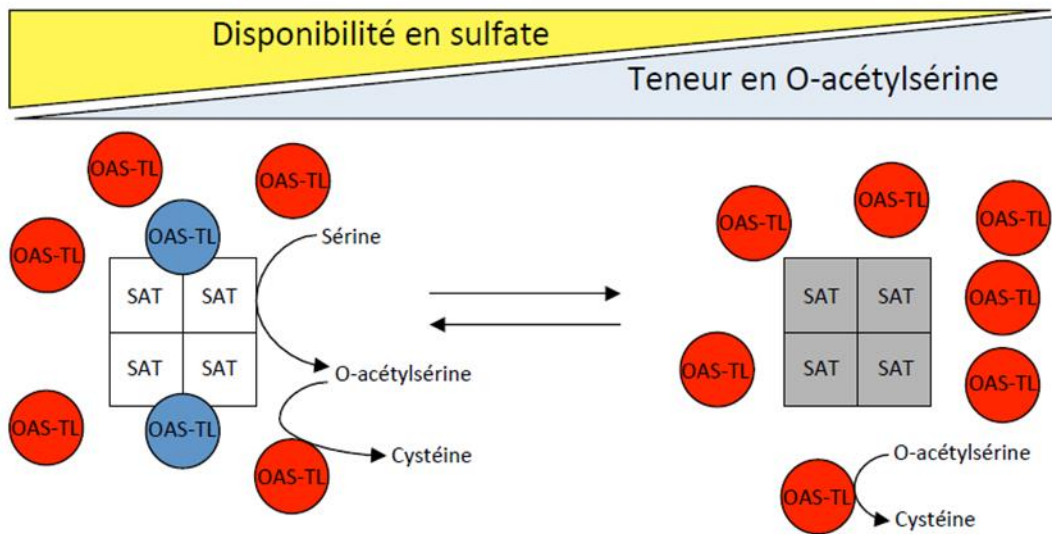


Figure II.11 Equilibre du complexe cystéine synthase (SAT/OAS-TL) en fonction de la disponibilité en sulfate. Les carrés blancs représentent la sérine acétyltransférase (SAT) active, les gris la SAT inactive. Les cercles rouges représentent l'O-acétylsérine thiol-lyase (OAS-TL) active, les bleus OAS-TL inactive (Wirtz et Hell, 2006 ; D'hooghe, 2013).

2004) provoquant la dissociation du complexe rendant ainsi la SAT inactive et l'ensemble des OAS-TL actives (Droux *et al.*, 1998), ce qui entraîne également une accumulation de sérine (Nikiforova *et al.*, 2004) (**Figure II.11**). La cystéine ainsi formée peut être incorporée au sein des protéines, elle est également le précurseur de la méthionine, du glutathion, de vitamines et de coenzymes (Leustek et Saito, 1999 ; Kopriva *et al.*, 2009). Une limitation en S provoque une diminution des teneurs de l'ensemble des composés soufrés notamment dans les feuilles, tels que les teneurs en SO_4^{2-} , en cystéine, en glutathion alors que la teneur en méthionine est maintenue (Blake-Kalff *et al.*, 1998 ; Nikiforova *et al.*, 2004 ; Parmar *et al.*, 2007). La teneur en SAM, précurseur de la synthèse des chlorophylles, diminue également. L'induction de l'expression de gènes codant deux enzymes (SAMS : SAMsynthétase et AH : adénosylhomocystéinase) impliquées dans le recyclage de la SAM en méthionine pourrait expliquer la diminution de la teneur en SAM et le maintien de celle en méthionine (Nikiforova *et al.*, 2004).

Les **microARNs** jouent un rôle clé dans le contrôle du développement de la plante et de la réponse à une limitation en S. Les microARNs constituent une classe d'ARN non codants de petits ARN qui régulent de façon post-transcriptionnelle des mARNs cibles par clivage et/ou répression de la traduction (Liang et Yu, 2010). Par exemple, le micro-ARN miR395 qui cible les transcrits de trois gènes codant l'ATPS (*Aps1*, *Aps3* et *Aps4*) et du gène *sultr2.1*, est fortement induit par une limitation en S chez *A. thaliana* (Kawashima *et al.*, 2011). Ces auteurs ont aussi démontré que ce miR395 serait impliqué dans l'augmentation de la translocation du sulfate vers les parties aériennes lors d'une limitation en S, de façon à permettre une assimilation plus efficace du sulfate dans les feuilles. Cette induction de la synthèse de miR395 est contrôlée par SLIM1 (pour Sulfur LIMitation 1), un facteur de transcription clé de la voie d'assimilation du S (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2006 ; Kawashima *et al.*, 2009). MiR395 et SLIM1 maintiennent un niveau optimal des transcrits de l'ATPS pour permettre une augmentation du flux par la voie d'assimilation du sulfate dans les plantes limitées en S (Kawashima *et al.*, 2011). Le facteur de transcription SLIM1 régule négativement la synthèse des glucosinolates lors d'une limitation en S, réprimant l'expression de facteurs de transcription spécifiques de la famille MYB (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2006) et favorisant ainsi la voie d'assimilation réductrice du sulfate. Une étude plus récente a montré que la signalisation redox, qui intervient lors d'une limitation en S, serait aussi impliquée en amont de SLIM1 dans la régulation de la synthèse de miR395 (Jagadeeswaran *et al.*, 2014).

II.1.3. La remobilisation du S dans la plante

En condition non limitante en S, la **remobilisation du S** des feuilles vers les organes en croissance et les graines est faible chez le colza, mais elle est induite en cas de limitation en S (Buchner *et al.*, 2004b ; Parmar *et al.*, 2007 ; Dubousset *et al.*, 2009). Une remobilisation efficace du S endogène peut suffire pour faire face à une limitation en S transitoire. Cependant, une carence longue et sévère est susceptible de provoquer des perturbations physiologiques résultant de régulations complexes entre les métabolismes soufré, carboné et azoté. Les transporteurs du **groupe 4** (SULTR4.1 et SULTR4.2), localisés dans la membrane vacuolaire, sont responsables de l'efflux de sulfate de la vacuole (Kataoka *et al.*, 2004b). Ils sont préférentiellement exprimés dans les cellules périvasculaires aux niveaux foliaire et racinaire chez *A. thaliana*. En réponse à une limitation en S, l'expression des gènes (*Sultr4.1* et *Sultr4.2*) codant les transporteurs de sulfate vacuolaire est augmentée au niveau foliaire chez *A. thaliana* (Kataoka *et al.*, 2004b) et chez *B. napus* (Dubousset *et al.*, 2009 ; Abdallah *et al.*, 2010) (Figure II.9). L'expression de *Sultr4.1* est plus rapidement augmentée que celle de *Sultr4.2* (Parmar *et al.*, 2007 ; Dubousset *et al.*, 2009 ; Abdallah *et al.*, 2010) mais le gène *Sultr4.2* est induit plus fortement (jusqu'à environ 100 fois) que le gène *Sultr4.1* (induit entre 5 et 15 fois) en cas de limitation en S par rapport à des plantes bien alimentées en S (Dubousset *et al.*, 2009). Le sulfate vacuolaire préalablement stocké est ainsi remobilisé permettant une redistribution du sulfate des feuilles matures, des feuilles âgées et des racines vers les organes en croissance (Blake-kalff *et al.*, 1998 ; Parmar *et al.*, 2007 ; Dubousset *et al.*, 2009 ; Abdallah *et al.*, 2010). Chez *B. napus*, il a été montré que malgré la remobilisation du sulfate, le potentiel osmotique foliaire est maintenu constant, au moins durant une première phase, suggérant ainsi qu'une accumulation d'autres composés osmotiquement actifs ou une réduction de la teneur en eau puisse intervenir pour maintenir le potentiel osmotique à un état stable. Lorsque la limitation en S est prolongée, il a été observé une diminution du potentiel osmotique d'environ 10 % (Lee *et al.*, 2013). Enfin, il a été montré que lors d'une limitation en S, la mobilisation du sulfate requis pour maintenir la croissance se produit jusqu'au moment où la croissance est limitée, et que le nitrate s'accumulait dans les feuilles (Abdallah *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2013 ; Sarda *et al.*, 2014).

Ces différents résultats issus de la littérature suggèrent donc que le sulfate vacuolaire puisse contribuer de façon significative au potentiel osmotique, et que sa mobilisation précoce lors d'une carence en S serait compensée par l'accumulation d'autres composés. L'identification de ces composés et la compréhension des mécanismes impliqués pourraient constituer une première stratégie pour cibler des indicateurs précoces de la nutrition soufrée.

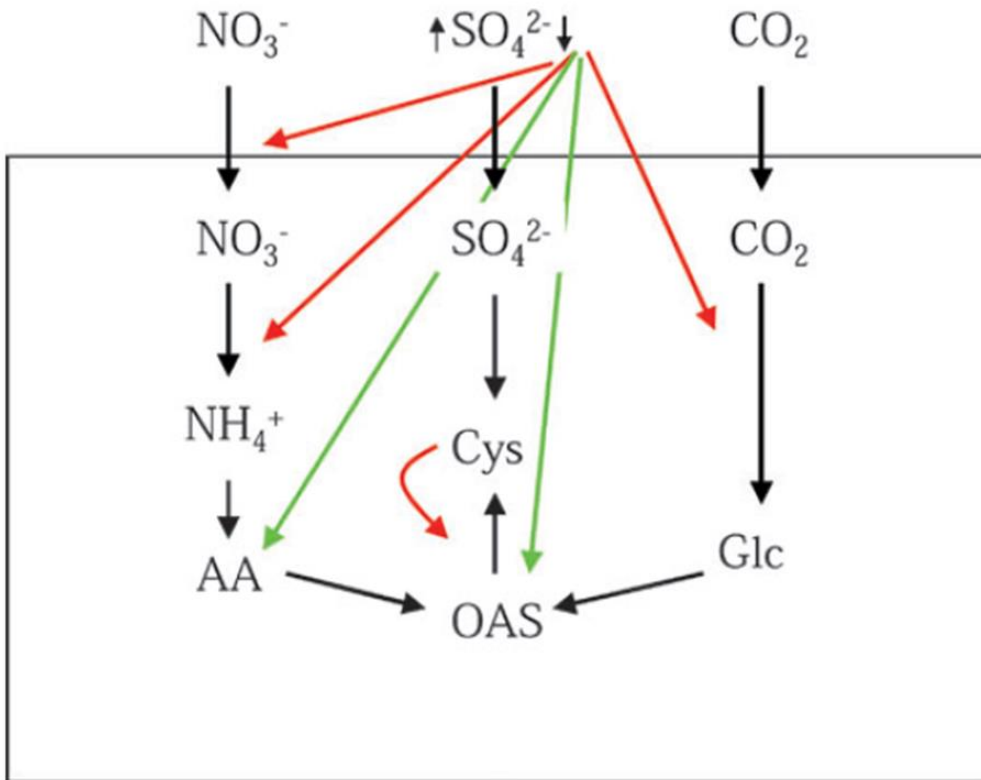


Figure II.12 Représentation schématique de la régulation de l'assimilation du C et du N en fonction de la disponibilité en S et des composés sulfurés. Les flèches rouges représentent la répression des étapes métaboliques, les vertes représentent l'induction des processus ou l'augmentation de la teneur en métabolites (flèches dirigées vers les métabolites). AA : acides aminés, Glc : glucose, OAS : O-acétylsérine (Kopriva et Rennenberg, 2004).

II.2. Effets d'une limitation en S sur les interactions avec d'autres métabolismes

II.2.1. Les métabolismes azoté et carboné

Le S est connu pour interagir avec la quasi-totalité des macronutriments et des micronutriments. Une représentation simple de la complexité des **interactions entre les métabolismes S, N et C** a été proposée par Kopriva et Rennenberg (2004) (**Figure II.12**). Une limitation en S conduit à une inhibition de l'assimilation du C et du N, mais aussi à l'accumulation d'acides aminés non sulfurés en raison de la disponibilité réduite en cystéine et méthionine pour la synthèse des protéines.

Chez *A. thaliana*, l'accumulation d'acides aminés non sulfurés comme la sérine, la glycine, la glutamine, l'asparagine ou le tryptophane a été observée en réponse à une limitation en S (Nikiforova *et al.*, 2003, 2004, 2005). L'accumulation de ces acides aminés, chez *B. napus* (Lee *et al.*, 2013) et chez *Spinacea oleacera* (Prosser *et al.*, 2001), entraîne **l'inhibition de l'absorption et de l'assimilation du nitrate** via une diminution des activités nitrate réductase (NR) et glutamine synthétase (GS) (Migge *et al.*, 2000 ; Miller *et al.*, 2007 ; Nacry *et al.*, 2013). Il a été suggéré que l'accumulation d'acides aminés lors d'une limitation en S résulte plutôt de l'hydrolyse des protéines synthétisées antérieurement que de la synthèse de nouveaux acides aminés (Lee *et al.*, 2013). Lors d'une limitation en S, il a aussi été reporté que le nitrate peut s'accumuler dans les feuilles (McGrath et Zhao, 1996 ; Prosser *et al.*, 2001 ; Koralewska *et al.*, 2009 ; Abdallah, 2010 ; Kaur *et al.*, 2011 ; Sarda *et al.*, 2014) suggérant que l'assimilation du nitrate est plus affectée que son absorption. Il existe donc une interaction forte entre les besoins de la plantes en N et en S, de manière à ce que l'insuffisance de l'un réduit l'absorption et/ou l'assimilation de l'autre (Abdin *et al.*, 2003). Il a été montré qu'une forte alimentation en N stimule la croissance de la plante, augmentant ainsi les besoins en S de la plante et donc l'effet d'une limitation en S lorsqu'il n'est pas disponible dans le milieu (Zhao *et al.*, 1993 ; Kast *et al.*, 1995 ; Malhi *et al.*, 2005).

Une limitation en S aboutit aussi à une **inhibition de la photosynthèse** induite par la fermeture stomatique (Ahmad et Abdin, 2000b). L'intensité de cette inhibition est principalement due à la baisse de la teneur en sulfolipides, en chlorophylles, en RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) et à la baisse des activités des photosystèmes I et II (PSI et PSII). Les sulfolipides entre dans la composition des membranes thylakoidiennes et favorisent les réactions photochimiques de la photosynthèse. En cas de limitation en S, la diminution des sulfolipides limiterait le transfert d'énergie au sein de ces membranes, ce qui réduirait les capacités photosynthétiques de la plante (Nikiforova *et al.*, 2003). Ces auteurs ont également montré que cette réduction des capacités photosynthétiques pourrait aussi provenir de nombreuses altérations

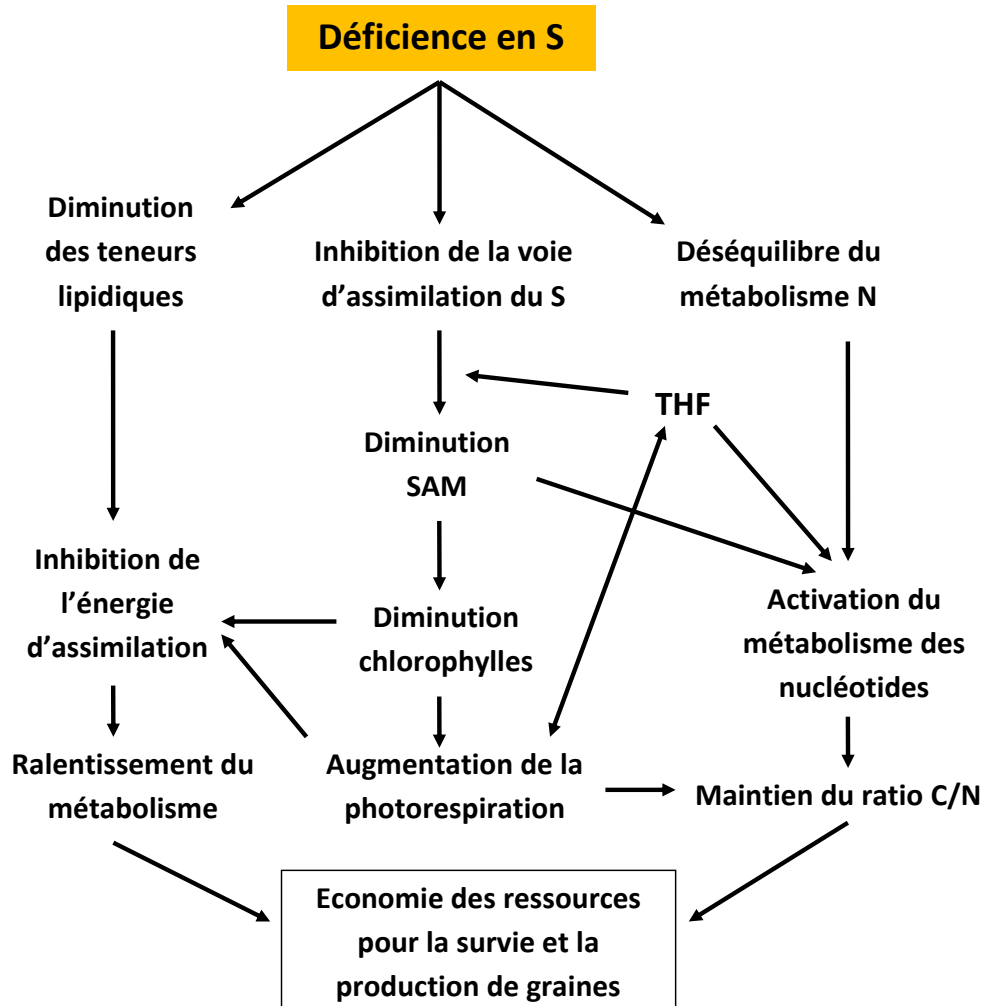


Figure II.13 Schéma de synthèse des processus physiologiques conduisant à une réorientation du métabolisme chez des plantes d'*A. thaliana* exposées à une privation en S. SAM : S-adenosylméthionine, THF : tétrahydrofurane (Nikiforova *et al.*, 2005).

des centres Fe-S des protéines du PSI (Nikiforova *et al.*, 2003). L'augmentation des teneurs en H₂O₂ et l'accumulation d'anthocyanes (impliqués dans la protection face au stress oxydatif) dans les feuilles de plantes limitées en S suggèrent qu'une limitation en S entraîne un stress oxydatif (D'hooghe *et al.*, 2013). La perturbation du statut oxydatif de la plante conduirait alors à la perte du PSII (May *et al.*, 1998 ; Hirai *et al.*, 2003). Cette perte associée à une diminution des teneurs en protéines soufrées, particulièrement en RuBisCO (Ahmad et Abdin, 2000b), pourrait être la conséquence d'une inhibition de la synthèse des protéines essentielles au bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique. De plus, une limitation en S engendrerait une réorientation du métabolisme carboné vers la **production d'énergie** en inhibant la synthèse de saccharose et d'amidon et en stimulant la glycolyse et certaines réactions du cycle de Krebs (Hirai *et al.*, 2003 ; Nikiforova *et al.*, 2005). Cette réorientation métabolique permettrait à la plante de survivre et de maintenir la production des graines (Nikiforova *et al.*, 2005) (**Figure II.13**).

L'ensemble de ces résultats montre qu'en réponse à une limitation en S, les perturbations des métabolismes N et C interviennent assez tardivement dans la cinétique de réponse du végétal. Le phénomène massif de mobilisation du sulfate vacuolaire, permis grâce à l'induction des transporteurs du groupe 4, intervient de façon plus précoce pour maintenir la croissance du colza. Ce phénomène semble donc être à priori une meilleure cible pour la recherche d'indicateurs de la nutrition soufrée.

II.2.2. Les métabolismes du Molybdène et du Sélénium

Si certaines interactions entre le métabolisme du S et le métabolisme d'autres éléments tels que P, K, Zinc (Zn), fer (Fe), Molybdène (Mo), Sélénium (Se) et B ont été précédemment décrites en terme de réponses physiologiques ou de rendement des cultures, peu ont été appréhendées dans un contexte de limitation en S (Abdin *et al.*, 2003 ; Malhi *et al.*, 2005). Seules les **interactions du niveau de disponibilité en S avec les métabolismes du Mo et du Se** ont été plus particulièrement étudiées. Le Mo est un micronutriment essentiel pour la plante utilisé principalement pour la biosynthèse du cofacteur Moco qui intervient dans le fonctionnement d'enzymes majeures telles que la nitrate réductase (réduction du nitrate en nitrite), la sulfite oxydase (oxydation du sulfite en sulfate), la xanthine déshydrogénase (dégradation des purines dans le métabolisme N), la nitrogénase (fixation de l'azote chez les légumineuses) et l'aldéhyde oxydase (synthèse de l'acide abscissique, auxine et glucosinolates). Il joue ainsi un rôle essentiel dans les métabolismes S et N (Maathuis et Diatloff, 2013). Une relation antagoniste entre l'absorption du molybdate, du sélérate et du sulfate a été démontrée chez différentes espèces comme par exemple *B. napus*, *B. juncea* et *T. aestivum* (Balik *et al.*, 2006 ; Shinmachi *et al.*, 2010 ; Malagoli *et al.*, 2012 ; De kok *et al.*, 2011 ;

Schiavon *et al.*, 2012). Ces auteurs ont montré une accumulation de Mo et de Se lors d'une alimentation pauvre en S et suggèrent que leur accumulation pourrait être due à une absorption non spécifique par les transporteurs racinaires de sulfate. En effet, le molybdate, le sélénate et le sulfate sont des analogues présentant des propriétés chimiques similaires (charge, taille et structure) (Dudev et al., 2004 ; De kok *et al.*, 2011 ; Bittner, 2014) et pourraient donc être en concurrence pour les mêmes transporteurs (Shinmachi *et al.*, 2010 ; Stroud *et al.*, 2010 ; Harris *et al.*, 2014). Lors d'une expérimentation en plein champ sur le blé, Shinmachi *et al.* (2010) ont montré que l'accumulation importante de Mo et de Se, dans une plante avec une faible fertilisation S, ne peut pas être entièrement expliquée par la seule intervention du transporteur MOT1 (SULTR5.2) et qu'elle était conjointe avec une augmentation de l'expression des gènes codant les transporteurs de sulfate tels que par exemple *Sultr1.1* et *Sultr4.1*. L'ensemble de ces résultats souligne que lors d'une faible alimentation en S, une accumulation forte de Mo et de Se serait une conséquence de la forte induction des transporteurs de sulfate en réponse à une limitation en S.

L'étude de l'accumulation du Mo et du Se peut donc fournir une piste intéressante pour la recherche d'indicateur précoce lors d'une limitation de la nutrition soufrée. Finalement, une étude approfondie des interactions entre le S et les autres nutriments permettrait aussi de mieux appréhender les interactions pouvant exister entre la nutrition soufrée et les autres nutriments afin de fournir un guide pour une fertilisation équilibrée entre les éléments et ainsi optimiser le rendement et la qualité des cultures.

II.3. Effets d'une limitation en S sur le rendement et la qualité des graines

Une limitation en S peut se traduire par une **diminution des rendements et de la qualité** des graines de colza. Les impacts d'une limitation en S diffèrent **selon le stade de développement** auquel elle se produit et **selon le niveau de réserves soufrées** préalablement accumulées, notamment sous forme de sulfate vacuolaire (Dubousset *et al.*, 2010). Ainsi, une limitation tardive intervenant au stade de développement des graines n'a qu'un très faible impact sur le rendement et la qualité des graines, probablement en raison de la compensation assurée par la mobilisation des réserves de SO_4^{2-} , alors qu'une limitation qui intervient plus précocement, lors de l'émergence de l'inflorescence, réduit la teneur en lipides des graines. Lorsque la limitation en S intervient très précocement dans le cycle de développement du colza, en début de montaison, il a été observé une baisse de rendement pouvant aller jusqu'à -45 % ainsi qu'une diminution des teneurs en S, N, lipides et protéines dans les graines (Dubousset *et al.*, 2010).

De nombreuses études ont montré l'impact d'une limitation en S sur le **rendement en grain** de la culture de colza (Janzen et Bettany 1984 ; McGrath et Zhao 1996 ; Malhi *et al.*, 2007). Par exemple, une expérimentation menée en conditions de plein champ en Ecosse, sur trois géotypes de colza a montré qu'en moyenne, l'absence de fertilisation S réduit le rendement grainier de -48 % comparativement à la même culture ayant reçu une fertilisation de 32 kg de S par ha (Walker et Booth, 2003).

Lors d'une absence de fertilisation soufrée, il a été montré une baisse des teneurs et de la qualité en huile, en protéines et en lipides dans les graines de colza réduisant les **qualités nutritionnelles** de l'huile et des tourteaux de colza (Dubousset *et al.*, 2010 ; Mahli *et al.*, 2007 ; D'hooghe *et al.*, 2014 ; Brunel-Muguet *et al.*, 2015a). Une restriction des apports de S permet toutefois une réduction des teneurs en glucosinolates dans les graines (Zhao *et al.*, 1997 ; Dubousset *et al.*, 2010), pouvant ainsi limiter l'effet anti-nutritif des glucosinolates et augmenter le caractère appétant du tourteau de colza pour les animaux (Walker et Booth, 2003). Bien que la proportion en acides gras dans les graines soit contrôlée génétiquement, elle peut être considérablement altérée par une limitation en S : celle des acides gras indésirables à longues chaînes, comme les acides érucique et éicosénique, peut être augmentée (Ahmad et Abdin, 2000a) alors que celle en acides stéarique, oléique et linoléique est par contre diminuée (D'hooghe *et al.*, 2014). Une augmentation du ratio N:S des protéines de graines de colza a aussi été observée en réponse à une absence de fertilisation S, ce qui traduit une réduction de la qualité protéique (Zhao *et al.*, 1997).

Compte tenu des conséquences importantes d'une limitation en S sur le rendement et la qualité des produits récoltés, il est essentiel de maîtriser au mieux la fertilisation soufrée. L'utilisation d'indicateurs de la nutrition soufrée peut être un moyen d'accéder à une meilleure gestion des apports de S aux cultures.

III. Les indicateurs de la nutrition soufrée

III.1. Définitions : diagnostic, indicateurs et Outil d'Aide à la Décision

La fertilisation raisonnée constitue une composante essentielle d'une agriculture raisonnée, le but étant d'apporter une fertilisation suffisante et efficace pour la nutrition de la culture selon des objectifs quantitatifs et qualitatifs de production. Il existe différentes méthodes de raisonnement de la fertilisation visant à ajuster la dose d'engrais au cours de la culture pour éviter les excès et les carences en fonction des objectifs de récolte et de l'état de la culture.

Ce raisonnement, souvent associé à l'utilisation d'Outils d'Aide à la Décision, peut ainsi permettre d'optimiser la dose d'engrais apportée, son fractionnement ou déterminer la localisation optimale de l'apport.

Pour raisonner les apports sur les cultures, il est nécessaire de préalablement **diagnostiquer** l'état de nutrition des plantes, c'est-à-dire de déterminer le statut nutritionnel de la culture au moment de l'échantillonnage en analysant la composition du sol et/ou des plantes. Rasmussen *et al.* (1977) suggèrent que pour diagnostiquer la déficience en nutriment, l'analyse d'un critère donné est basée sur l'hypothèse que la croissance et le rendement sont réduits lorsque ce critère est inférieur à une certaine **valeur dite critique** ou **seuil** (Blake-Kalff *et al.*, 2001). Le succès du diagnostic dépend donc du choix déterminant et pertinent de la valeur critique, qui à défaut peut entraîner des erreurs de diagnostic de l'état de nutrition de la culture. Idéalement, il faudrait réaliser un **pronostic**, c'est-à-dire prédire si l'état nutritionnel de la plante à un moment donné est susceptible d'affecter le rendement à la récolte, en particulier si les exigences de la plante sont différentes pour la croissance végétative et la production des semences (Pinkerton, 1998). Mais comme il n'est pas possible de réaliser un pronostic fiable à 100 %, Blake-Kalff *et al.* (2001) ont suggéré que le pronostic ne peut être exprimé qu'en probabilité de pertes de rendement en se basant sur le **diagnostic** du statut soufré au moment de l'échantillonnage.

Le diagnostic de l'état de nutrition soufrée des plantes peut se faire à l'aide d'**indicateurs**, qualitatif ou quantitatif, devant présenter différentes qualités techniques :

- La **fidélité** : l'outil doit fournir les mêmes résultats sous des conditions identiques (répétabilité) et il doit être utilisable dans des conditions différentes et des temps différents, tout en donnant des résultats similaires (reproductibilité). A titre d'exemple, un indicateur de la nutrition soufrée sera considéré comme fidèle si le résultat de la mesure n'est pas affecté au cours d'une même journée ou par les quelques jours suivants, ni par l'opérateur.

- La **robustesse** correspond à la capacité de l'outil à ne pas être affecté par de faibles fluctuations des facteurs environnementaux. Un indicateur robuste peut être utilisé sur une large gamme de conditions du milieu, c'est-à-dire quelles que soit la localisation géographique, les conditions pédoclimatiques de la parcelle et quelle que soit la variété de la culture.

- La **spécificité** : l'outil doit uniquement répondre au critère ciblé. Un indicateur de la nutrition soufrée est spécifique s'il varie uniquement lorsque la nutrition soufrée varie.

- La **sensibilité** est l'aptitude de l'outil à détecter de faibles variations. Un indicateur de la nutrition soufrée est sensible s'il reflète les variations, mêmes faibles, de la nutrition soufrée et permet ainsi une détection **précoce** de la limitation en S.

Tableau II.2 Grilles de décision proposées par Arvalis en octobre 2013. Grille de préconisation d'apport de S ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de SO_3) pour le blé et l'orge d'hiver entre début et fin tallage. (A) Situations sans apports réguliers et fréquents de matière organique (moins de 3 apports en 10 ans). (B) Situations avec apports fréquents de matière organique depuis au moins 10 ans (au moins 3 apports en 10 ans). Arvalis, (www.arvalis-infos.fr).

A

Sans apports réguliers d'effluents d'élevage	pluviométrie 1/10 au 1/03	Précédent		
		Colza avec apport de SO_3	Maïs irrigué avec apport soufre > 60 u SO_3	Autre
Risques élevés : sols superficiels filtrants; argilocalcaire superficiel; sol sableux; limon caillouteux à silex	<i>forte ou normale (>250)</i>	40	30	50
	<i>faible (<250)</i>	20	20	30
Risques moyens : argilocalcaire profond; limon battant froid hydromorphe	<i>forte (>400 mm)</i>	30	20	40
	<i>normale</i>	20	0	30
	<i>faible (<300)</i>	0	0	0
Risques faibles : sols profonds sains; limon argileux profond, limon franc	<i>forte (>400 mm)</i>	20	0	30
	<i>normale</i>	0	0	20
	<i>faible(<300)</i>	0	0	0

B

Apports réguliers d'effluents d'élevage	pluviométrie 1/10 au 1/03	Précédent	
		Colza avec apport de SO_3	Autre
Risques élevés : sols superficiels filtrants; argilocalcaire superficiel; sol sableux; limon caillouteux à silex	<i>forte ou normale (>250)</i>	20	30
	<i>faible (<250)</i>	0	0
Risques moyens : argilocalcaire profond; limon battant froid hydromorphe	<i>forte (>400 mm)</i>	0	0
	<i>normale</i>	0	0
	<i>faible (<300)</i>	0	0
Risques faibles : sols profonds sains; limon argileux profond, limon franc	<i>forte (>400 mm)</i>	0	0
	<i>normale</i>	0	0
	<i>faible(<300)</i>	0	0

- L'**ergonomie** et la **convivialité** : l'outil doit être simple et rapide à utiliser et à comprendre. Les paramètres d'entrées ne doivent pas être trop fastidieux à renseigner et les résultats de sorties doivent être facilement interprétables par l'utilisateur.

Les indicateurs et les préconisations qui en résultent, peuvent être regroupés sous forme d'un **Outil d'Aide à la Décision (OAD)**. En nutrition des plantes, un OAD permet d'effectuer le pilotage de la fertilisation par les doses et les modalités d'apports d'engrais que propose l'interface. Les outils de diagnostic de l'état de nutrition soufrée des plantes doivent donc permettre de mettre en évidence précocement des problèmes de nutrition S pour conduire à une utilisation appropriée des engrais soufrés afin de limiter, au maximum, l'impact d'une limitation en S (même ponctuelle) sur le rendement de la culture.

III.2. Les indicateurs de la nutrition soufrée déjà proposés

De nombreuses études ont cherché à développer des indicateurs de la nutrition soufrée qui permettraient d'ajuster les doses de fertilisants soufrés aux besoins réels de la culture. Différentes techniques d'approches pour mettre en place un indicateur de la nutrition soufrée ont été envisagées, comme l'utilisation de grilles d'aide à la fertilisation, la modélisation, l'analyse de sols, l'analyse de plantes par méthodes optiques ou biochimiques. Idéalement, toutes ces méthodes devraient être utilisées conjointement pour obtenir une idée globale de la situation de la culture mais pour des raisons pratiques évidentes, souvent une seule de ces méthodes est utilisée (Blake-Kalff *et al.*, 2004).

III.2.1. Les grilles de décision et d'évaluation

Arvalis propose une **grille de décision** utilisable pour les cultures de céréales (blé et orge). Cet outil permet de déterminer si un apport de S est nécessaire et le cas échéant, permet de moduler cet apport entre 20 et 50 Kg SO₃.ha⁻¹. Les règles de décision sont basées sur quatre critères : le type de sol, la pluviométrie hivernale, le passé de fertilisation organique et l'apport de soufre sur la culture précédente (**Tableau II.2**). Le risque de carence en S est tout d'abord lié à la nature du sol définissant trois niveaux de risque : élevé, modéré ou faible, qui sont déterminés selon le stock de soufre organique du sol, les facteurs de minéralisation et les risques de lessivage. Puis l'évaluation du risque de carence est confronté à la pluviométrie hivernale, plus les pluies sont fortes en hiver plus le risque de lessivage du sulfate est important. Les apports organiques interviennent également dans l'évaluation du risque de carence en S, des apports organiques

Tableau II.3 Grille d'évaluation permettant d'apprécier les risques de carences en soufre de différentes cultures et de décider d'un apport d'engrais soufré. COMIFER, (www.comifer.asso.fr).

Paramètres	Évaluation (nombre de points)			Points obtenus
Situation proche d'une zone industrielle, d'une agglomération	non (2)	oui (4)		
Type de sol	sableux (1)	limoneux (3)	argileux (5)	
Taux d'humus	<2 % (2)	2- 4 % (3)	>4 % (4)	
Profondeur de l'enracinement	faible (2)	importante (4)		
Incidence de la structure (sol compacté, limon battant, semelle de labour)	existant (1)	partiellement existant (3)	inexistant (5)	
Teneur en N min en début de végétation par rapport à la moyenne observée sur plusieurs années	en-dessous de la moyenne (2)	dans la moyenne (3)	au-dessous de la moyenne (4)	
Conditions climatiques				
Précipitations octobre-mars par rapport à la moyenne observée sur plusieurs années	au-dessous de la moyenne (1)	dans la moyenne (3)	en-dessous de la moyenne (5)	
Hiver froid	non (1)	oui (4)		
Pratiques culturales				
Cultures exigeantes en soufre (colza, chou, légumineuses)	tous les 3 ans (2)	tous les 4 ans (3)	tous les 5 ans (4)	
Culture actuellement implantée	colza, chou, légumineuse (1)	autre culture (3)		
Carence en soufre déjà constatée	oui (1)	non ou on ne sait pas (3)		
Niveau de rendement (qx/ha)				
Colza	élevé : >35	moyen : 25-35	faible : <25	
Céréales	élevé : >70 (2)	moyen : 50-70 (3)	faible : <25 (4)	
Culture dérobée engrais vert	non (2)	oui (4)		
Fertilisation				
Engrais organique d'origine animale : UGB/ha	0 à 1 (2)	1 à 2 (3)	>2 (4)	
Emploi au cours des 3 dernières années d'engrais minéraux à teneur notable en soufre	non (2)	oui (4)		
				Somme des points
Évaluation				
25-32 points : risque élevé de carence en soufre, fertilisation soufrée indispensable				
33-38 points : surveillance rigoureuse des cultures, fertilisation soufrée recommandée				
39-61 points : pas de carence en soufre à craindre				

fréquents diminuant le risque. L'apport important de S sur une culture précédente augmente la quantité de soufre minéral résiduel en sortie d'hiver, et diminue ainsi le risque de carence en S. Dans cette grille de décision, seuls deux types de précédents culturaux sont pris en compte, le colza avec apport de soufre et le maïs irrigué avec un apport supplémentaire de soufre par les eaux d'irrigation contenant du sulfate. Cet outil a été établi à partir de 350 essais sur blé avec des modalités d'apport de soufre allant de 0 à 60 kg de $\text{SO}_3 \cdot \text{ha}^{-1}$ sous différentes formes et à différents stades de la culture. Cette grille de décisions apporte des éléments qui pourraient être pris en compte pour la culture de colza mais les doses recommandées n'ont pas été adaptées pour cette dernière.

Une **grille d'évaluation des risques de carence en S**, mise en place par le service agronomique de BASF, a été proposée par le COMIFER (Comité d'Etude et de Développement de la Fertilisation Raisonnée) en 1995 pour décider de l'opportunité d'appliquer une fertilisation soufrée sur différentes cultures (**Tableau II.3**). Il s'agit d'un système basé sur l'attribution de notes selon différents paramètres : les caractéristiques du site de culture (localisation, types de sol), le climat (précipitations hivernales et type d'hiver), les pratiques culturales (rotation des cultures, niveaux de rendement), de la culture en place et des pratiques de fertilisation passées. La somme des points de tous les paramètres évalués permet d'évaluer le risque de carence en S pour la culture en place.

III.2.2. La modélisation

Il n'existe à ce jour que peu de démarches de modélisation visant à estimer et prédire le statut S des cultures.

Le premier modèle de prédiction des besoins en fertilisation soufrée a été développé par Sinclair et Saunders (1984) sur les pâturages en Nouvelle-Zélande. Il s'agit d'un **modèle mécaniste basé sur les quantités de S** requises pour équilibrer les pertes de S et pour maintenir un statut soufré stable. Ce modèle est un outil qui fournit des estimations correctes de besoins en engrais S afin de maintenir le statut soufré de la culture mais il ne peut pas déterminer les besoins en S en fonction des changements du statut soufré du sol (Edmeades *et al.*, 2005). Par la suite, Watkinson et Perrott (1990) ont pris en considération ce dernier point en développant un modèle entre le S du sulfate du sol et le pool de S organique facilement disponibles pour la plante dans les sols en Nouvelle-Zélande.

Au Royaume-Uni, McGrath et Zhao (1995) ont proposé un **modèle qualitatif** pour prédire les risques de déficience en S chez les céréales à une échelle large, celle des Îles Britanniques. Ce modèle prend en compte les dépôts de S atmosphérique, la minéralisation potentielle du S

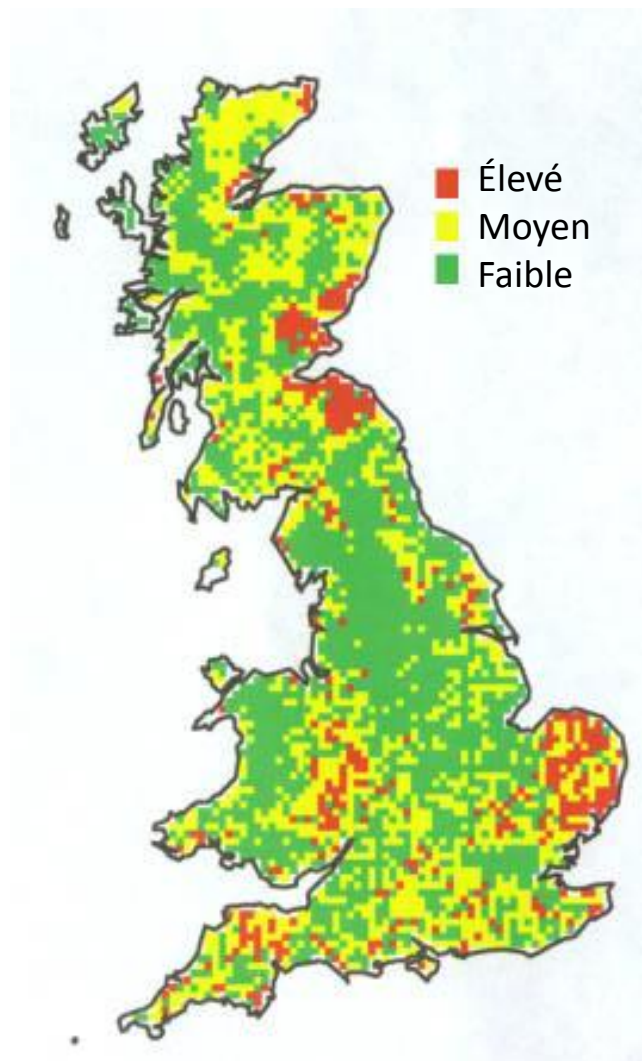


Figure II.14 Cartographie des zones à risques de déficience en S chez les céréales au Royaume-Uni selon une échelle de risque : élevé, moyen ou faible, générée par modélisation des données de dépôts atmosphériques de S en 1992 (McGrath et Zhao, 1995).

organique (en prenant en compte la teneur du sol en matière organique) et les facteurs influençant les potentielles pertes de sulfate par lessivage comme le type de sol, la texture du sol, le pH et les précipitations annuelles. Les auteurs considèrent que ce modèle tient compte des facteurs principaux impactant la disponibilité en S, mais précisent que certains paramètres n'ont pas été intégrés au modèle comme les réserves en S du sous-sol, les reliquats des cultures et l'utilisation de fumure animale. Ce modèle a permis la cartographie du Royaume-Uni selon une échelle de risque de carence en S : élevé, moyen ou faible (**Figure II.14**). Cette approche permet d'identifier les zones où les déficiences en S sont susceptibles de se produire à une échelle large, mais elle n'est pas adaptée à l'échelle parcellaire (Zhao *et al.*, 1999).

III.2.3. L'analyse de sol

De nombreuses méthodes d'analyses de sol ont été proposées pour prédire la carence en S et ainsi gérer au mieux la fertilisation soufrée (pour revue Scherer, 2001, 2009). Estimer la quantité de S du sol disponible pour les plantes nécessite de prendre en considération les différentes formes de S du sol potentiellement disponibles pour la plante c'est-à-dire le SO_4^{2-} soluble, le SO_4^{2-} adsorbé et la fraction du S organique pouvant être minéralisée pendant la période de croissance de la plante (Bettany *et al.*, 1974).

De nombreuses méthodes d'**extraction chimique** ont été testées pour déterminer les fractions de S inorganiques du sol, l'extraction du sol étant réalisée avec de l'eau ou des solutions d'extraction saline contenant du CaCl_2 , du NaCl , du LiCl , du $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, du CaCO_3 , du NaH_2PO_4 , du KH_2PO_4 , du NH_4F , du NaOH ou du NaHCO_3 . En général, les solutions salines d'extraction, préférées à l'eau pure, présentent également quelques limitations telles que des risques de précipitation du sulfate comme par exemple lors d'une extraction au CaCl_2 . D'autres méthodes existent pour déterminer le S du sol disponible pour la plante comme les **membranes ou résines échangeuses d'anions** qui sont des outils plus simples et efficaces pour extraire le SO_4^{2-} du sol et évaluer sa disponibilité pour la plante (Scherer, 2001, 2009).

La fraction de S organique du sol peut être une source importante de S pour la plante. Quelques méthodes chimiques comme l'extraction au NaHCO_3 et CaCO_3 permettent d'extraire une partie du S organique du sol. Déterminer la fraction du S organique du sol potentiellement minéralisable implique l'**incubation** des échantillons de sol dans des conditions aérobies et le calcul de la quantité de S libéré pendant un certain temps. Cependant, la quantité de S minéralisé dépend de la présence ou de l'absence de plante et de la technique d'incubation utilisée (Scherer 2001,

A



B



Figure II.15 (A) Plante de colza présentant des symptômes de carence en soufre au stade végétatif. HGCA Knowledge Centre (www.hgca.com) (B) Jeunes feuilles de colza complètement développées présentant des symptômes de chlorose et de déformation induits par une carence en S sévère au stade début d'élongation de la tige (Hanecklaus *et al.*, 2008).

2009). Actuellement, aucune procédure simple, rapide et satisfaisante n'est proposée pour estimer la fraction disponible du S organique du sol des cultures au champ.

Terres Inovia et Arvalis propose une règle de décision qui repose sur la teneur en S du sol extrait par la **méthode Scott** (Scott et Anderson, 1978). Cette méthode par extraction chimique au K_2HPO_4 est décrite comme étant capable de mesurer la quantité de S minéral sous forme de SO_4^{2-} disponible au moment de l'échantillonnage et la quantité probable de S issue de la minéralisation de printemps (Merrien, 1997). Selon cette méthode, un sol est considéré comme pauvre en S pour la culture de colza si la teneur en S est inférieure à 18 mg S kg^{-1} de sol sec à la sortie de l'hiver, un apport d'engrais soufrés permettra alors d'augmenter le rendement dans de nombreuses situations. A l'inverse, si la teneur en S est supérieure à 18 mg S kg^{-1} de sol sec, un apport d'engrais n'aura aucun effet sur le rendement. Cependant, cette méthode ne prédit qu'imparfaitement la minéralisation dans différents types de sols d'où les absences de réponse à la fertilisation observées dans certaines situations.

Cependant, les analyses de sol ne fournissent pas de résultats satisfaisants pour estimer la quantité de S effectivement disponible pour la culture, en raison notamment de la forte variabilité des concentrations en SO_4^{2-} du sol dans l'espace et dans le temps qui résulte des variations de l'activité microbienne du sol (minéralisation et immobilisation), du lessivage, du ruissellement de surface, des dépôts atmosphériques, des exsudats racinaires, de la sénescence racinaire et foliaire et de l'absorption de la culture (Scherer, 2001 ; Malhi *et al.*, 2005). Les résultats d'analyses d'un échantillon de sol sont donc essentiellement valables pour le moment et le lieu précis de l'échantillonnage, ils ne permettent pas de prédire la disponibilité du S de façon fiable sur l'ensemble du cycle de développement de la culture (Schnug et Haneklaus, 1998). De plus, certains auteurs considèrent qu'il n'existe pas de relation claire entre la quantité de S du sol disponible au moment de l'échantillonnage et le rendement final de la culture (McGrath *et al.*, 1996). En raison de la forte variabilité des quantités de soufre extraites du sol et des faibles coefficients de corrélation entre les teneurs en SO_4^{2-} du sol et les paramètres de la plante comme les teneurs, l'absorption du S et le rendement, les analyses de sols sont donc peu ou pas utilisées pour gérer la fertilisation S (Szulc *et al.*, 2014).



Figure II.16 Enrichissement des feuilles en anthocyanes chez le colza lors d'une carence en S (Schnug et Haneklaus, 1998).

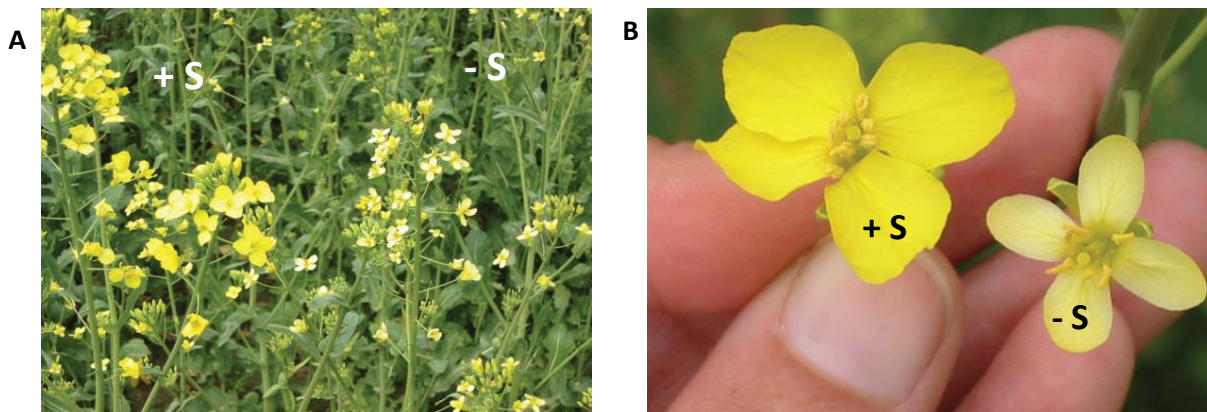


Figure II.17 (A) Floraison blanche du colza et (B) changements morphologiques des pétales lors d'une carence sévère en S comparé à des plantes bien alimentées en soufre (Haneklaus *et al.*, 2008).



Figure II.18 Déformation des siliques avec réduction du nombre de graines par siliques et enrichissement en anthocyanes chez le colza en cours de maturation lors d'une carence sévère en S (Haneklaus *et al.*, 2008).

III.2.4. L'analyse de plantes

Le diagnostic de la nutrition soufrée peut aussi se faire à l'échelle de la plante, soit par des analyses macroscopiques, soit par des analyses biochimiques.

III.2.4.1. Les indicateurs macroscopiques

– Le diagnostic visuel

Le colza peut commencer à développer des **symptômes de carence en S** à des stades de croissance très précoces, dès les premiers stades de croissance des feuilles (Schnug et Haneklaus, 1998). Généralement, les symptômes visibles de carence en S apparaissent en premier lieu sur les organes les plus jeunes de la plante, plus précisément sur les jeunes feuilles en croissance, bien que ces symptômes puissent couvrir l'ensemble de la plante lorsque celle-ci est à un stade précoce (Schnug et Haneklaus, 1998). Les plantes de colza souffrant de carence sévère en S présentent une marbrure caractéristique sur les feuilles. La chlorose commence à se développer à partir du bord de la feuille et se propage sur le limbe en laissant des zones vertes le long des nervures (Haneklaus *et al.*, 2008) (**Figure II.15**). Lorsqu'une limitation sévère en S dure dans le temps, les feuilles de colza prennent une couleur pourpre-rougeâtre, caractéristique de leur enrichissement en anthocyanes (**Figure II.16**). Cette chlorose tout comme l'accumulation d'anthocyanes bien qu'intervenant systématiquement lors des carences en S, ne sont cependant pas caractéristiques de ce type de carence, puisque beaucoup de carences en d'autres éléments conduisent également à ces symptômes (Schnug et Haneklaus, 1998). Un diagnostic visuel de la carence en S en condition de production nécessite donc, en plus d'une expertise adéquate, d'être associé à des analyses de sols et/ou de plantes (Bennett, 1993). Par ailleurs, une alimentation en N élevée favorise l'expression des symptômes de la carence en S et inversement (Walker et Booth, 1994) mais les raisons de ce phénomène ne sont pas encore identifiées selon Haneklaus *et al.*, (2008). Durant la floraison, les plantes de colza carencées en S présentent des pétales plus petits, de forme ovale et de couleur blanche comparé aux plantes non carencées en S où les pétales sont plus grands, plus arrondis et présentant la couleur jaune caractéristique de la floraison du colza (**Figure II.17**). Ce symptôme de floraison blanche est très difficilement identifiable à l'œil nu en conditions de plein champ. Le nombre de siliques et de graines par silique est significativement réduit chez les plantes sévèrement carencées en S (Schnug et Haneklaus, 1998). Comme les feuilles, les siliques de plantes carencées en S peuvent également présenter une couleur pourpre-rougeâtre Haneklaus *et al.*, 2008 (**Figure II.18**). Globalement, ces symptômes macroscopiques interviennent lors de carence en S sévère et restent trop tardifs pour être utilisés comme indicateurs. Ces symptômes visuels étant la

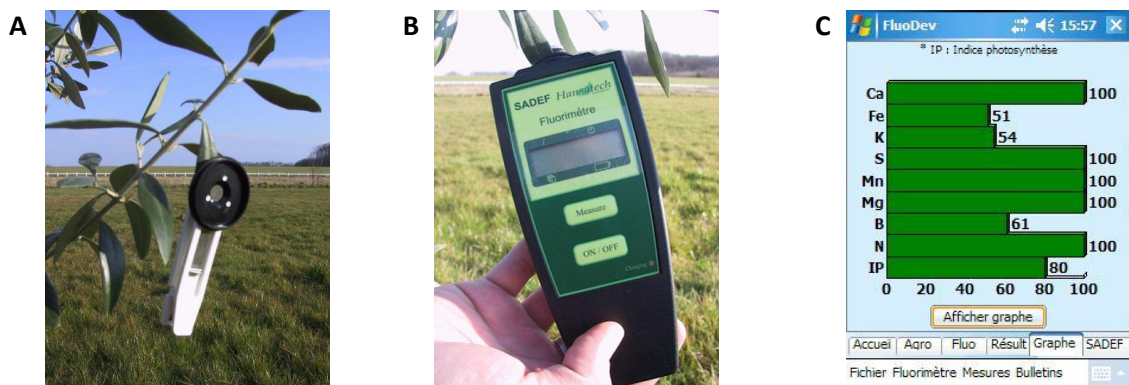


Figure II.19 Outil de la société SADEF-LACO permettant de mesurer la fluorimétrie est constitué (A) de clips à placer sur les feuilles, opercule fermé pour les placer à l'obscurité, (B) du fluorimètre qui permet de réaliser les mesures en le connectant au clip et en ouvrant l'opercule et (C) d'un pocket PC qui interprète et établit le diagnostic. SADEF, (www.fluorimétrie.com).

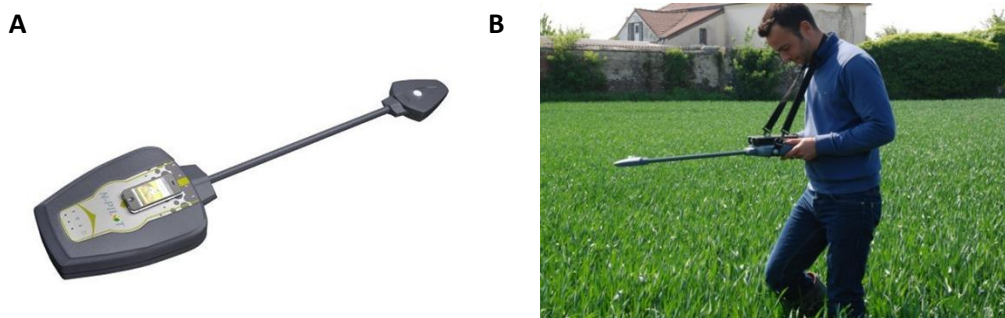


Figure II.20 (A) Outil N-pilot de la société grande Paroisse AZF est un réflectomètre portable, qui combine la technologie de mesure de réflectance à un smartphone. (B) Outil N-pilot en conditions d'utilisation, pendant que la personne se déplace dans la parcelle, il analyse en continu le rayonnement de la parcelle. Borealis L.A.T, (www.borealis-lat.com/fr/fr/conseils/n-pilot-r.html).

conséquence des perturbations métaboliques induites par la carence en S, il peut être suggéré que ces dysfonctionnements métaboliques puissent constituer des indicateurs plus précoces de la carence en S.

– Les OAD optiques

La **fluorimétrie** est un outil proposé par la société SADEF-LACO (pôle d'Aspach) qui permet de contrôler l'état nutritionnel des plantes de 8 éléments : calcium (Ca), Fe, K, Mn, magnésium (Mg), B, N et depuis 2007 le S. Cet outil présente l'avantage d'être utilisable directement en conditions de plein champ et d'offrir un diagnostic en 30 minutes. Le principe du diagnostic par fluorimétrie repose sur l'émission de fluorescence au niveau des feuilles. Le fluorimètre permet de déterminer le rendement quantique, correspondant au rendement photosynthétique qui traduit l'efficacité du PSII à utiliser la lumière pour la conversion photochimique. Le diagnostic est alors obtenu par comparaison à une banque de données de référence acquise sur des plantes mono carencées produites en serre (**Figure II.19**). Les déficiences peuvent ainsi être détectées avant l'apparition des symptômes visuels mais l'outil ne renseigne pas sur les doses d'engrais à apporter. La fluorimétrie est utilisée depuis 2004 par une coopérative agricole du sud de la France pour optimiser la fertilisation en viticulture afin de limiter les carences en N, Mg, Mn, K ou Fe. Elle a également été testée sur blé pour la détermination du niveau de nutrition azotée. Cet outil a été testé en conditions contrôlées sur la déficience en S chez le colza en comparaison à une déficience en S chez le maïs (Bourrié, 2007). Les résultats de ces essais ont montré que la détection de la déficience en S est possible par fluorescence chlorophyllienne. En effet, la limitation en S fait chuter la fluorescence, indiquant une baisse du rendement quantique, avant l'apparition des symptômes visuels. Cependant, aucune conclusion formelle ne peut être établie de ces essais sur colza puisque les différences de fluorescence entre plantes témoins et déficientes en S ne sont significatives que sur deux dates de test. Aucune utilisation de cet outil sur des limitations en S chez le colza en conditions de plein champ n'a été reportée à ce jour.

Le GPN® soufre est diffusé depuis 2007 par la société Grande Paroisse AZF, filiale du groupe Borealis Lat. La méthode est analogue à celle du GPN azote aussi appelé GPN-Pilot® ou N-Pilot®, elle est basée sur un système de mesure optique par **réflectométrie** (**Figure II.20**). La réflectance est la partie du rayonnement lumineux réfléchi par le végétal. L'indice de réflectance estimé par l'appareil permet de mesurer les teneurs en chlorophylles et la quantité de biomasse de la parcelle. Cet outil est un réflectomètre portable, relié à une application *via* un smartphone, utilisable au champ qui permet d'obtenir un conseil immédiat (en 15 minutes) concernant la dose d'engrais à apporter pour couvrir les besoins de la culture. L'appareil présente l'avantage d'effectuer une

mesure rapide mais il est moins fiable pour des cultures dont le couvert est hétérogène. Il s'appuie sur une comparaison entre une zone sur-fertilisée et le reste de la parcelle, et sur le fait que des plantes ayant des niveaux de nutrition différents présentent des indices de réflectances distincts. Cependant, il semble qu'avec de tels outils, il reste difficile de déterminer quel élément nutritif est déficient (Ayala-Silva et Beyl, 2005). Les cultures référencées pour l'utilisation de cet appareil sont le blé tendre, de force et dur ainsi que l'orge d'hiver et de printemps, l'utilisation sur le colza étant actuellement en cours de développement.

III.2.4.2. Les indicateurs biochimiques

Dans la littérature, l'analyse des tissus des plantes est usuellement préférée aux techniques de diagnostic précédemment présentées. Les analyses de tissus des végétaux semblent être un meilleur moyen d'identifier les limitations en S et d'évaluer la fertilité des sols et la gestion des cultures. En effet, le statut soufré des tissus paraît être plus étroitement lié à la quantité de S réellement disponible pour la culture au moment de l'échantillonnage (Melsted *et al.*, 1969). Le soufre se présente sous différentes formes chimiques dans la plante (Hell et Rennenberg, 1997) et quasiment la totalité d'entre elles a été étudiée comme indicateur du statut soufré de la plante mais il n'existe pas de consensus général quant à la meilleure approche. Ces paramètres peuvent être divisés en deux groupes : les valeurs absolues et les paramètres composites se présentant sous forme de ratio.

– L'échantillonnage pour l'analyse des tissus

Les teneurs en nutriments varient à la fois en fonction de l'offre mais aussi selon l'organe et l'âge de la plante. Ainsi, la prise en compte du type d'organe mais aussi de l'âge de l'organe et de la plante sont d'une importance cruciale pour éviter les erreurs d'interprétation (Freney *et al.*, 1978 ; Spencer et Freney, 1980 ; Janzen et Bettany, 1984 ; Scaife et Bums, 1986). En effet, ces deux paramètres doivent être en accord avec la référence à partir de laquelle les valeurs critiques (seuils) ont été déterminées pour l'évaluation du statut soufré.

Le **type d'organe et le stade à choisir lors du prélèvement** ont été discutés dans la littérature. Chez les dicotylédones, l'échantillonnage à partir de jeunes feuilles complètement développées et présentant une forte activité photosynthétique semblent être le meilleur choix car : i) elles présentent les teneurs les plus élevées en S (par rapport à tous les organes de la plante), ii) elles sont les puits les plus importants pour le S, iii) leur teneur en S varie rapidement en fonction des modifications de l'état de nutrition (Orlovius, 2003) et enfin iv) elles sont disponibles durant toute la période de la croissance végétative (Schnug et Haneklaus, 1998). Chez le colza, il a été

montré qu'au cours du développement de la plante, il y avait moins de variation des teneurs en composés dans les feuilles jeunes que dans les feuilles matures. Dans cette étude, les feuilles jeunes sont définies comme étant les feuilles complètement développées les plus jeunes et les feuilles matures comme les feuilles vertes positionnées le plus bas sur la tige (Blake-Kalff *et al.*, 2000a). Les graines semblent être moins appropriées pour le diagnostic car les concentrations en S des graines seraient principalement déterminées par des facteurs génétiques (Haneklaus et Schnug, 1992 ; Schnug, 1989).

Concernant la **période de l'échantillonnage**, un prélèvement précoce lors du stade végétatif de la culture permet de pouvoir intervenir pour corriger la fertilisation soufrée. Cependant, pour le colza, il est préférable que ce prélèvement ne soit pas effectué trop tôt dans la saison car les plantes sont petites et ont des besoins en S moins importants que lors de la reprise de croissance (Blake-Kalff *et al.*, 2004). En outre, un échantillonnage trop tardif qui consisterait par exemple à prélever les graines, ne semble pas pertinent en vue d'acquérir des informations sur la culture en cours et de corriger la fertilisation mais pourrait être utilisé pour mieux gérer la fertilisation de la culture suivante (Blake-kalff *et al.*, 2004 ; Carver, 2005). Le timing idéal de prélèvement semble donc être juste au moment où les plantes commencent à croître rapidement, lors de l'extension de la tige et avant la date de la première fertilisation afin de pouvoir ajuster l'apport en fonction du résultat du test.

– Les indicateurs biochimiques et moléculaires potentiels

Les teneurs en SO_4^{2-} ou en **S total** ont été proposées par Randall *et al.* (1981), Scaife et Burns (1986) et Pinkerton (1998) comme des indices pertinents pour évaluer le statut S de la plante. Ces deux indices présentent un changement net de valeurs entre les plantes déficientes et bien alimentées en S. Ils présentent aussi l'avantage de ne nécessiter qu'une seule mesure analytique. Selon plusieurs auteurs, les teneurs en SO_4^{2-} seraient plus sensibles que celles en S total et seraient de ce fait, plus à même d'être utilisées comme indicateur de la nutrition S. En effet, le SO_4^{2-} est la forme majeure de transport et de stockage dans la plante. Pinkerton (1998) a proposé des valeurs critiques de S total pour la culture de colza comprise entre 0,20 et 0,25 % de matière sèche pour diagnostiquer une déficience en S avant ou à la floraison et lorsque l'approvisionnement en S du sol est stable. Les valeurs critiques des teneurs en SO_4^{2-} sont comprises entre de 0,02 à 0,04 % de matière sèche. Les arguments principaux réfutant l'utilisation des teneurs en SO_4^{2-} ou S total comme indicateur du statut de nutrition soufrée de la plante reposent sur l'existence de variations de ces teneurs au cours du stade de développement sans cohérence chronologique apparente (Blake-Kalff *et al.*, 1998, 2000a) et sur le fait que beaucoup d'autres facteurs puissent influencer leurs valeurs

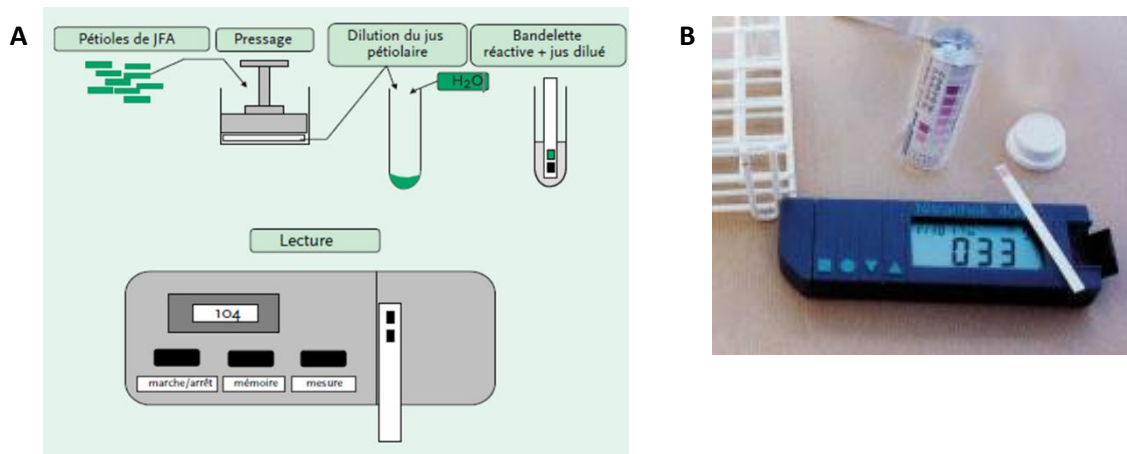


Figure II.21 (A) Protocole d'utilisation du test Nutricheck (JFA : jeunes feuilles adultes) (Infos Ctifl 179). (B) Réflectomètre Nutricheck avec bandelette réactive utilisé pour l'étape de lecture de la concentration en SO_4^{2-} dans le jus de la plante. Arvalis, (www.arvalis-infos.fr).

comme l'activité physiologique et l'apport d'autres éléments minéraux (Freney, 1966 ; Janzen et Bettany, 1987). Quand le SO_4^{2-} et le S total sont utilisés comme indicateurs, il reste néanmoins important de connaître le stade de développement et l'organe de la plante utilisé pour la mesure des teneurs afin d'utiliser les valeurs critiques appropriées (Blake-Kalff *et al.*, 2000b).

Le **Nutricheck** a été développé par la société challenge Agriculture en 2000. Cet outil est un réflectomètre de terrain qui permet de doser divers éléments (NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} et Cl^-) dans les jus de plante par lecture d'une bandelette réactive (**Figure II.21**). Pour gérer un apport éventuel de fertilisation soufrée, cette méthode repose sur la **concentration en SO_4^{2-}** dans le jus de base de tige des céréales au stade deux nœuds. Le risque de déficience en S est défini pour un seuil compris entre 100 et 150 $\text{mg SO}_4^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$, en dessous duquel une intervention de correction de la fertilisation est à envisager au stade deux nœuds. Arvalis a mené des expérimentations tests de l'outil Nuticheck sur céréales et les résultats ont montré une discrimination satisfaisante des situations de déficiences en S même si les seuils semblent devoir être adaptés. L'utilisation de cet outil est donc utile pour aider à diagnostiquer les déficiences en S des cultures de céréales mais actuellement les références (stade de prélèvement, seuil) ne sont pas encore validées pour les cultures de colza.

L'utilisation de composés, issus directement du métabolisme du S tels que le **glutathion** ou affectés par celui-ci comme les **amides**, a été testée comme indicateur de la déficience en S (Zhao *et al.*, 1996 ; Blake-kalff *et al.*, 1998, 2000a, 2000b ; Honsel *et al.*, 2012). Ces molécules ont montré une réponse précoce à la privation en S. Ainsi, les teneurs en glutathion présentent une diminution rapide (Zhao *et al.*, 1996 ; Blake-Kalff *et al.*, 1998, 2000b ; Honsel *et al.*, 2012) alors que celles de l'asparagine et la glutamine augmentent (Zhao *et al.*, 1996). Cependant, en conditions de plein champ, il a été montré que le glutathion n'est pas un indicateur adapté pour diagnostiquer des déficiences en S puisque les teneurs sont peu variables (1,5 à 2 fois) entre les plantes déficientes ou suffisantes en S. De plus, les teneurs en glutathion diminuent au cours du développement de la plante et ce, indépendamment des traitements en S. Ainsi, des plantes correctement alimentées en S (donc avec une croissance plus forte que des plantes déficientes en S) et des plantes déficientes en S peuvent avoir des teneurs en glutathion très proches. (Blake-kalff *et al.*, 2000b). Enfin, l'analyse des teneurs de ces composés pour détecter une déficience en S apparaissent peu spécifiques car elles peuvent être impactées par d'autres facteurs tels qu'un stress salin, hydrique ou thermique (Rabe, 1999 ; Tausz 2001).

D'après Howarth *et al.* (2009) un test basé sur l'**expression des gènes** pourrait fournir un bon moyen de diagnostiquer rapidement une limitation en S de la plante. Les auteurs ont donc menés une étude des gènes candidats qui répondent à une limitation en S chez le blé. Ils ont montré

que l'expression du gène *sdi1* était particulièrement induite dans les feuilles et les racines en réponse à une limitation en S et de façon spécifique puisque que ce gène n'est pas induit lors de limitation en P, K ou Mg. De plus, l'expression de ce gène présentant une réponse très précoce à la limitation en S, Howarth *et al.* (2009) proposent son utilisation comme indicateur du statut nutritionnel en S chez le blé. La fonction du gène *sdi1* reste inconnue mais l'étude du mutant Knockout d'*A. thaliana* a montré que ce gène serait impliqué dans un rôle fonctionnel lié à l'utilisation du sulfate vacuolaire lors d'une limitation en S (Howarth *et al.*, 2009). Cependant, il est clair qu'il n'est pas possible de quantifier facilement ce type d'indicateur moléculaire en condition de plein champ ni d'en dériver des préconisations de fertilisation S.

Il a été montré que les **ratios** de composés minéraux ou organiques peuvent prédire de façon plus fiable le statut soufré de la plante que l'utilisation des valeurs absolues de ces composés. En effet, différentes études ont suggéré que les ratios entre composés présentent moins de variation en fonction du stade de développement et du taux de croissance des plantes que les valeurs individuelles de teneurs en certains composés (Rasmussen *et al.*, 1977 ; Maynard *et al.*, 1983 ; Blake-Kalff *et al.*, 2000a, 2001).

Le **ratio N:S**, basé sur les interactions entre les métabolismes N et S, est fréquemment utilisé comme indicateur de la carence en S. En 1977, Rasmussen *et al.* ont proposé le ratio N:S comme indicateur de la carence en S chez le blé au **stade végétatif**. Relativement aux valeurs absolues comme par exemple les teneurs en S total, le ratio N:S diminue de façon moins importante au cours du développement de la plante et est moins affecté par la fertilisation N (Spencer *et al.*, 1977 ; Spencer et Freney, 1980). L'utilisation du ratio N:S comme indicateur de la nutrition soufrée nécessite un échantillonnage à un stade de développement précis (McGrath et Zhao, 1996) mais également sur un type d'organe précis car le N et le S ne suivent pas les mêmes dynamiques au cours du développement (Pasricha et Fox, 1993). Diverses études ont proposé une valeur critique du ratio N:S au stade végétatif pour diagnostiquer les carences en S des cultures de colza au champ : Maynard *et al.* (1983) ont proposé une valeur critique de 6 au stade rosette, Zhao *et al.* (1997) ont suggéré une valeur critique moyenne de 10, Blake-Kalff *et al.* (2000b) et Blake-Kalff *et al.* (2001) ont, quant à eux, proposé une valeur moyenne du ratio N:S de 9 tout en précisant que le ratio N:S critique diminue pendant la période de croissance (allant de 10 au début de l'élongation de la tige à 7,2 juste avant l'émergence de l'inflorescence). La valeur seuil pour diagnostiquer la déficience varie selon les cultures, par exemple pour la culture de blé, elle est comprise entre 15 et 19 (Blake-Kalff *et al.*, 2001). Le ratio N:S nécessite deux déterminations analytiques. De plus, ce ratio doit être interprété avec prudence car un fort ratio N:S, traduisant une déficience en S, peut-être dû à un

excès de N sans modifications des teneurs en S et inversement. Par ailleurs, il est possible de mesurer un faible ratio N:S, suggérant une bonne alimentation S, alors que le N et le S sont tous les deux déficients. Afin d'améliorer la sensibilité de cet indicateur de la carence en S, il a été suggéré d'utiliser le ratio N:S conjointement à la valeur seuil du S total (Blake-kalff *et al.*, 2000b ; Randall *et al.*, 2003). Le **ratio N:S des graines** est beaucoup utilisé par les agronomes et l'industrie agricole qui le considèrent actuellement comme l'outil de diagnostic de la carence en S le plus précis. Toutefois, il est clair qu'il ne s'agit pas d'un outil de diagnostic prédictif, puisqu'il permet uniquement d'obtenir des indications en fin de culture dans le but de mieux gérer la fertilisation de la culture suivante (Randall *et al.*, 1981 ; Randall *et al.*, 2003 ; Blake-kalff *et al.*, 2004 ; Carver, 2005).

Le ratio **SO₄²⁻:Stotal** a été proposé par Spencer et Freney (1980) et Jones *et al.* (1980) comme un guide utile pour gérer la fertilisation soufrée et maintenir un rendement optimal en grains des cultures de blé. D'après ces auteurs, le ratio SO₄²⁻:Stotal semble fortement lié au rendement en grain et l'âge de la plante n'a que peu d'effet sur les valeurs critiques en condition de plein champ. Cet indice est présumé stable parce que les teneurs en S total et SO₄²⁻ sont affectées de façon similaire par l'âge de la plante et l'alimentation azotée. Cependant, Scaife et Burns (1986) critiquent le ratio SO₄²⁻:Stotal en se basant sur le fait que le changement des teneurs en S total est en partie dû à celle du SO₄²⁻ et donc que le numérateur et le dénominateur du ratio ne sont pas indépendants, ce qui biaise le résultat et réduit la sensibilité de l'indicateur. Des données plus récentes obtenues sur un grand nombre de parcelles de colza montrent qu'il existe une forte corrélation entre les teneurs en S total et en SO₄²⁻ dans les feuilles, les tiges et les graines du colza (Sarda *et al.*, 2014), ce qui permet également de montrer que cet indicateur perd de sa valeur en utilisant deux paramètres étroitement corrélés. Par ailleurs, la détermination de ce ratio nécessite l'utilisation de deux méthodes analytiques différentes sans bénéfice particulier (Schnug et Haneklaus, 1998). Sur le même principe, Maynard *et al.* (1983) ont proposé le ratio **HI-S:total S**, dans le quel HI-S correspond au soufre réductible dans l'acide iodhydrique (HI) c'est-à-dire aux composés soufrés non directement liés au carbone (comme les sulfates d'esters et les sulfamates) et facilement hydrolysable en sulfate. Ainsi, le HI-S est considéré comme une estimation du sulfate (Pinkerton, 1998). Maynard *et al.* (1983) affirment que la détermination de ce ratio au stade rosette, était l'indice le plus précis et cohérent pour prédire le rendement en grain des cultures de colza, en précisant que la valeur critique de ce ratio devait être supérieure ou égale à 0,38 pour prévenir une diminution de rendement due à une fertilisation S insuffisante. Cependant, les mêmes critiques que pour le ratio SO₄²⁻:Stotal ont été reportées (Randall, 2015).

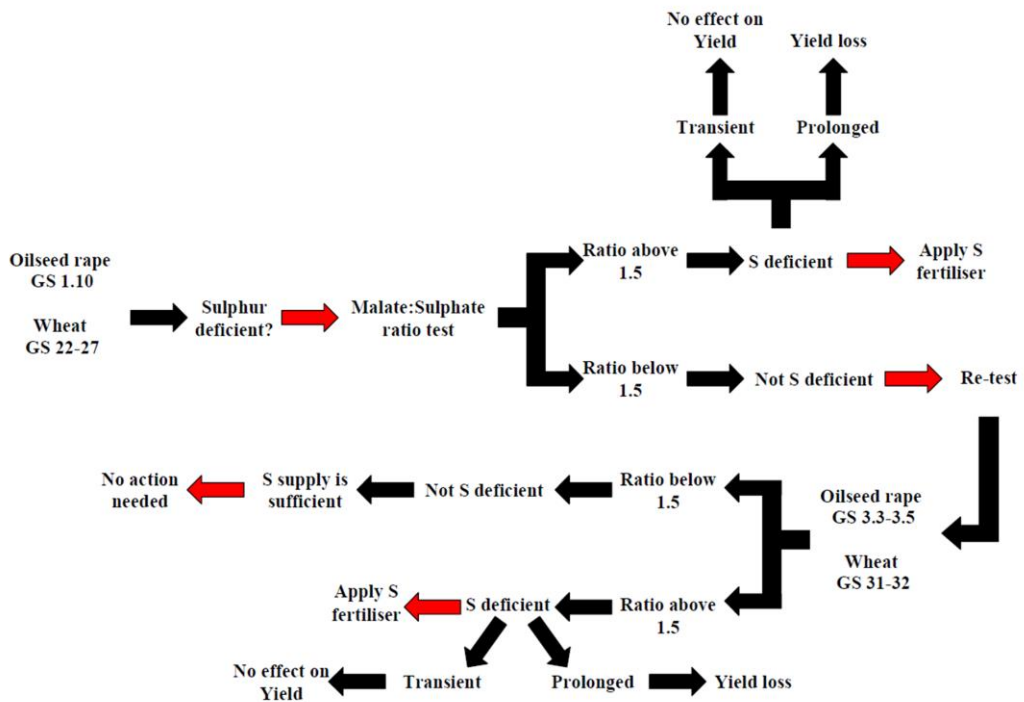


Figure II.22 Schéma d'interprétation des résultats du test malate:sulfate permettant de décider ou non d'un apport d'engrais S sur culture de blé ou de colza (Blake-Kalff *et al.*, 2004).

Le test **malate:sulfate** foliaire a été développé par l'Institute of Arable Crop Research (IACR) de Rothamsted (Royaume-Uni) et est proposé en routine depuis 2002, pour le colza et les céréales, par le laboratoire anglais Hill Court Farm Research pour un coût d'analyse d'environ 20€. La proposition d'un tel ratio est basée sur une des fonctions physiologiques du malate qui est de contrebalancer l'absorption d'anions et de cations dans les cellules végétales dans le but de maintenir l'équilibre de charge et le pH cytoplasmique. Il repose donc sur la relation inverse entre les teneurs en malate et en sulfate dans les feuilles : lors d'une limitation en S, les teneurs en sulfate diminuent dans les feuilles et vont être compensées par une augmentation des teneurs de malate et inversement (Blake-Kalff *et al.*, 2000a). Ce ratio ne nécessite qu'un seul type d'analyse par chromatographie ionique et il est déterminé à partir de l'aire des pics du chromatogramme, ce qui évite les problèmes de calibration qui peuvent exister entre les différents appareils. C'est le seul indicateur plante qui permet un diagnostic indépendamment du type de sol et de l'espèce tout en étant assez précoce pour pouvoir corriger la fertilisation si nécessaire. Même si le ratio malate:sulfate est considéré comme relativement indépendant de la fertilisation N, les auteurs (Blake-Kalff *et al.*, 2004) admettent néanmoins qu'une fertilisation N importante accroît pourtant les effets d'une limitation en S. Ce test présente l'avantage d'être stable tout au long du développement de la plante et la même valeur seuil peut donc être utilisée tout au long de la culture. Les auteurs ont ainsi déterminé la valeur critique du ratio malate:sulfate à 1,5 et proposent un diagramme d'interprétation des résultats du test (**Figure II.22**). Un ratio malate:sulfate > 1,5 indique une déficience en soufre alors qu'un ratio ≤ 1.5 indique que la disponibilité en soufre est suffisante au moment de l'échantillonnage. Ce ratio permet de distinguer les limitations transitoires des limitations prolongées si deux tests sont effectués à des stades différents du développement de la culture (Blake-Kalff *et al.*, 2004). Diverses études ont testé la fiabilité du test malate:sulfate. Reussi *et al.* (2011) ont critiqué le fait que les recherches pour la détermination du ratio ont été réalisées sur des sols qui présentent des propriétés typiques (faible contenu en matière organique < 2 %, pH > 6 et sol de texture sableuse) de sol à forte probabilité de réponse à l'application de S. Des études sur colza et blé ont montré que le ratio malate:sulfate surestime le diagnostic de déficience en S et suggèrent que les valeurs seuils ont besoin d'être réévaluées (Carver, 2005 ; Reussi *et al.*, 2011 ; Etude Arvalis, 2007) bien que Blake-Kalff *et al.*, 2004 justifiaient la pertinence de ces valeurs en précisant qu'une application d'engrais soufré pas forcément nécessaire était moins dommageable économiquement qu'une perte de rendement.

IV. Objectifs et hypothèses de recherche

Cette synthèse bibliographique a pu mettre en évidence les impacts d'une limitation en S sur le métabolisme, la croissance et la production en grains de la culture de colza lorsqu'elle n'est pas alimentée par une fertilisation soufrée adéquate. Dans le contexte actuel de l'oligotrophisation des sols en S et d'une gestion de la fertilisation soufrée pas toujours maîtrisée, **il paraissait donc essentiel, tant sur le plan environnemental qu'économique, d'optimiser la nutrition soufrée des plantes cultivées afin d'ajuster les apports d'engrais soufrés aux besoins réels des cultures.** Un moyen de répondre à cet objectif consiste à développer des indicateurs précoces et fiables de la nutrition soufrée. Comme l'étude bibliographique a pu le mettre en évidence, les indicateurs disponibles à ce jour ne permettent pas individuellement d'obtenir un diagnostic précis du statut soufré de la culture de colza et encore moins de préconiser les doses de fertilisants soufrés afin d'éviter les impacts négatifs de la limitation en S.

L'objectif principal de ce travail doctoral visait donc à identifier de nouveaux indicateurs de la nutrition soufrée reposant sur des mécanismes physiologiques de réponse précoce à une limitation en S chez le colza cultivé en conditions contrôlées. Cette espèce a été choisie en tant que modèle, d'une part à cause des travaux nombreux qui ont porté sur celle-ci au sein de l'UMR d'accueil mais aussi en raison de ses besoins importants en S. Un deuxième objectif consistait à valider ces indicateurs en condition de plein champ sur la même espèce mais aussi pour un plus large panel d'espèces (blé, maïs, pois, tomate, chou-fleur et *Medicago truncatula*) cultivées en conditions contrôlées, le choix de ces espèces ayant été réalisé dans le cadre du partenariat établi au sein du projet SERAPIS. Les critères de choix d'indicateurs que nous avons utilisé reposent, non seulement sur leur précocité mais aussi sur ceux requis pour développer à plus long terme un OAD. Outre un potentiel en termes de fidélité, de robustesse, de spécificité et de sensibilité, ces indicateurs devraient ensuite permettre de développer un OAD faisant preuve d'ergonomie et de convivialité. L'analyse bibliographique réalisée, et le relatif consensus résultant des travaux antérieurs portant sur de tels indicateurs, nous a conduit à privilégier des indicateurs dérivés de l'analyse du végétal plutôt que des indicateurs visuels ou issus de l'analyse du sol.

La première démarche expérimentale réalisée consistait à préciser la cinétique de réponse précoce du colza à une privation en S, réalisée en culture hydroponique. En effet, même si l'étude bibliographique montre que la cinétique de réponse du colza à une limitation en S semble globalement connue, avec une première phase de maintien de la croissance, il apparaît que les

perturbations métaboliques décrites restent relativement tardives. La première hypothèse que nous avons cherchée à tester expérimentalement reposait donc sur le fait que le sulfate des tissus végétaux puisse contribuer de façon significative au potentiel osmotique des tissus foliaires. Dès lors, sa mobilisation rapide induite par une limitation en S, couplée à un maintien transitoire du potentiel osmotique rapporté par certains auteurs, suppose l'existence de processus compensatoires. Nous avons donc émis l'hypothèse que la diminution des teneurs en sulfate des organes sources pourrait être compensée par une augmentation des teneurs en d'autres composés organiques ou minéraux afin de maintenir le potentiel osmotique cellulaire. Nous avons alors quantifié un panel de composés susceptibles d'être impliqués. De façon additionnelle, nous avons comparé les effets d'une privation en S et d'une privation en Cl, sachant que cet élément à l'opposé du S, est peu métabolisé et donc largement présent à l'état soluble, pouvant ainsi exercer un rôle majoritairement osmotique. La comparaison de ces deux traitements visait donc à distinguer les conséquences strictement osmotiques et/ou métaboliques d'une limitation en S. Dans un deuxième temps, une expérimentation sur une parcelle oligotrophe en S, soumise à différents niveaux de fertilisations en S et en N, a ensuite été réalisée afin de valider les indicateurs mis en évidence lors de l'expérimentation en conditions contrôlées et de développer une méthode plus simple d'analyse de ces indicateurs en conditions de plein champ. Enfin, les échantillons foliaires, issus de deux réseaux regroupant plus d'une centaine de parcelles de colza, ont été analysés pour tenter de proposer des valeurs seuils pour les indicateurs retenus afin d'identifier des conditions de nutrition S satisfaisantes, à risques ou déficientes. Ces travaux de recherche sont rapportés dans les chapitres 3 et 4 sous forme de deux publications.

La deuxième démarche de ce travail prenait en compte la description dans la littérature d'une potentielle accumulation de Mo et de Se dans la plante lors d'une limitation en S, résultant du fait que le sulfate, le molybdate et le sélénate seraient probablement absorbés par des transporteurs racinaires similaires compte tenu de leur similitude structurale (Shinmachi, 2010 ; Stroud *et al.*, 2010 ; Harris *et al.*, 2014). L'hypothèse qui en découle, et que nous avons testée expérimentalement en se focalisant sur le Mo (le seul considéré comme oligoélément), repose sur le fait qu'en l'absence de S dans le milieu, l'induction rapide et intense de l'expression des gènes codant des transporteurs de sulfate (Abdallah *et al.*, 2010) pourrait permettre une augmentation très rapide de l'absorption de Mo et donc de la teneur des tissus foliaires. Cette hypothèse a donc été testée chez du colza cultivé en conditions hydroponiques puis en conditions de plein champ et enfin pour un panel plus large d'espèces végétales. Les valeurs seuils pour l'indicateur proposé ont

été testées, comme précédemment, sur deux réseaux de parcelles de colza. L'ensemble de ces travaux de recherche est présenté au sein du chapitre V sous forme d'une publication.

Chapitre III

**Effet d'une privation en soufre sur
les composantes du potentiel
osmotique et sur le métabolisme
azoté dans les feuilles de colza :
identification d'un nouvel indicateur
précoce**



Chapitre III

Effet d'une privation en soufre sur les composantes du potentiel osmotique et sur le métabolisme azoté dans les feuilles de colza : identification d'un nouvel indicateur précoce

Préambule

Afin d'identifier des indicateurs précoces de la nutrition soufrée chez le colza et expliquer les mécanismes physiologiques sous-jacents, nous avons entrepris l'étude de la cinétique précise de réponse du colza à une privation en S en culture hydroponique. Cette étude s'est plus particulièrement focalisée sur le rôle osmotique du sulfate et la compréhension des mécanismes de compensations osmotiques qui peuvent être mis en place lors de la remobilisation du sulfate en cas de privation en S. Pour cela, les plantes ont été exposées pendant 28 jours à une privation en S ou en Cl, afin de différencier les réponses osmotiques, des réponses métaboliques. Un grand nombre de paramètres ont été mesurés afin d'identifier les composés pouvant potentiellement constituer des indicateurs précoces de la nutrition soufrée tout en étant impliqués dans les réponses physiologiques. Nous avons ainsi effectué des analyses osmotiques, moléculaires, isotopiques, ioniques et métaboliques.

Résultats majeurs :

Deux phases de réponse à une privation en S ont été identifiées : la première, précoce (0 à 13 jours), durant laquelle la croissance est maintenue grâce à la remobilisation du SO_4^{2-} vacuolaire permise grâce à une sur-expression des gènes codant des transporteurs tonoplastiques, *Sultr4.1* et *Sultr4.2*. Malgré la remobilisation du SO_4^{2-} , le potentiel osmotique foliaire reste constant grâce à l'accumulation de Cl^- , NO_3^- et PO_4^{3-} . Une phase tardive de réponse (au-delà de 13 jours), durant laquelle la croissance est affectée, se caractérise par des perturbations métaboliques, notamment une réduction de l'absorption et de l'assimilation du NO_3^- , probablement réprimés par une accumulation d'acides aminés. L'ensemble des résultats suggèrent que le ratio $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ des feuilles pourrait être utilisé comme indicateur précoce de la nutrition soufrée chez le colza.

Ces résultats ont été publiés sous la forme d'un article dans *Journal of Experimental Botany*, intitulé « Effect of sulfur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: identification of a new early indicator ».



RESEARCH PAPER

Effect of sulphur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: identification of a new early indicator

Elise Sorin^{1,2,3,4}, Philippe Etienne^{1,2,3}, Anne Maillard^{1,2,3}, Angel-Mari Zamarréño⁵, José-Maria Garcia-Mina⁵, Mustapha Arkoun⁴, Frank Jamois⁴, Florence Cruz⁴, Jean-Claude Yvin⁴ and Alain Ourry^{1,2,3*}

¹ Normandie Université, 14032 Caen, France

² UNICAEN, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

³ INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

⁴ Centre de Recherche International en Agrosceince, CRIAS-TAI, Groupe Roullier, 55 Boulevard Jules Verger, 35800 Dinard, France

⁵ Timac Agro Spain, Poligono de Arazuri-Orcoyen Calle C No. 32, 31160 Orcoyen, Spain

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: alain.ourry@unicaen.fr

Received 28 April 2015; Revised 28 May 2015; Accepted 3 June 2015

Editor: Stanislav Kopriva

Abstract

Identification of early sulphur (S) deficiency indicators is important for species such as *Brassica napus*, an S-demanding crop in which yield and the nutritional quality of seeds are negatively affected by S deficiency. Because S is mostly stored as SO_4^{2-} in leaf cell vacuoles and can be mobilized during S deficiency, this study investigated the impact of S deprivation on leaf osmotic potential in order to identify compensation processes. Plants were exposed for 28 days to S or to chlorine deprivation in order to differentiate osmotic and metabolic responses. While chlorine deprivation had no significant effects on growth, osmotic potential and nitrogen metabolism, *Brassica napus* revealed two response periods to S deprivation. The first one occurred during the first 13 days during which plant growth was maintained as a result of vacuolar SO_4^{2-} mobilization. In the meantime, leaf osmotic potential of S-deprived plants remained similar to control plants despite a reduction in the SO_4^{2-} osmotic contribution, which was fully compensated by an increase in NO_3^- , PO_4^{3-} and Cl^- accumulation. The second response occurred after 13 days of S deprivation with a significant reduction in growth, leaf osmotic potential, NO_3^- uptake and NO_3^- reductase activity, whereas amino acids and NO_3^- were accumulated. This kinetic analysis of S deprivation suggested that a $([\text{Cl}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{PO}_4^{3-}]) : [\text{SO}_4^{2-}]$ ratio could provide a relevant indicator of S deficiency, modified nearly as early as the over-expression of genes encoding SO_4^{2-} tonoplasmic or plasmalemmal transporters, with the added advantage that it can be easily quantified under field conditions.

Key words: *Brassica napus*, chlorine deprivation, indicator of S deficiency, nitrogen metabolism, osmotic potential, sulphur deprivation.

Abbreviations: AAs, total amino acids; DW, dry weight; NR, nitrate reductase; NSCs, total non-structural carbohydrates; Ntot, total nitrogen; OAs, total organic acids; Stot, total sulphur.

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Experimental Biology. All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Introduction

Compared to cereals, winter oilseed rape (*Brassica napus* L.), like many species in the Brassicaceae, requires a relatively large input of mineral nutrients such as sulphur (S). For example, to produce one tonne of seeds, 16 kg S are required by oilseed rape (McGrath and Zhao, 1996; Blake-Kalff *et al.*, 2001), and only 2–3 kg S are needed by wheat (*Triticum aestivum*) (Zhao *et al.*, 1999). As a consequence, oilseed rape is especially sensitive to S limitation. Thus, seed yield of oilseed rape is usually improved by S fertilization with doses depending on the environment in which the crop is being grown, usually 15–60 kg S ha⁻¹ (Grant *et al.*, 2012). For example, it is assumed that a supply of ~20 kg S ha⁻¹ is sufficient to satisfy the high S requirement of oilseed rape in the USA (Jackson, 2000) while the recommendations of the technical centre of oleaginous production in France (CETIOM) is ~30 kg S ha⁻¹. A precise recommendation for S fertilization remains difficult because of the lack of field-appropriate plant or soil S indicators, resulting in a wide variation of S doses applied under production conditions (from 0 to 112 kg S ha⁻¹, Sarda *et al.*, 2014).

Over the last few decades, S fertilization has become crucial in many agricultural areas, particularly in Western Europe, where industries have reduced atmospheric S pollution by replacing high S-containing coal and oil with low S natural gas, renewable energy sources and nuclear energy. These changes in industrial practices have caused a reduction in S emissions of ~80% since the 1980s (Blake-Kalff *et al.*, 2001) resulting in a major reduction in soil S deposition (McNeill *et al.*, 2005). These reduced anthropic S inputs together with changes in cropping systems, including the use of high yielding varieties coupled with intensive management practices, have thus created a decrease in the mineral S availability in soil that is especially prejudicial for S-demanding crops such as oilseed rape (Grant *et al.*, 2012).

Oilseed rape is particularly sensitive to mineral S limitation, which provokes multiple plant physiological changes leading to losses of yield and seed quality through modified lipid and protein composition of seeds (Janzen and Bettany, 1984; McGrath and Zhao, 1996; Scherer, 2001; Malhi *et al.*, 2007; D'Hooghe *et al.*, 2014). Moreover, it has been shown that decreased S availability reduces nitrogen (N) use efficiency of oilseed rape (Fismes *et al.*, 2000; Dubousset *et al.*, 2010) as S and N metabolism are tightly linked. A lasting S limitation leads to an accumulation of amino acids in *B. napus* (Lee *et al.*, 2013) or in spinach (*Spinacea oleacera*) (Prosser *et al.*, 2001), which may down-regulate N uptake and assimilation (Miller *et al.*, 2007; Nacry *et al.*, 2013). It was further suggested that the leaf amino acid accumulation under S deprivation resulted from the hydrolysis of previously synthesized proteins rather than from *de novo* synthesis (Lee *et al.*, 2013). In the meantime, it has been reported that nitrate (NO₃⁻) may accumulate in leaves during S deficiency (McGrath and Zhao, 1996; Prosser *et al.*, 2001; Koralewska *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2011; Sarda *et al.*, 2014) suggesting that NO₃⁻ assimilation is more affected than its uptake.

While oilseed rape is well recognized to be highly sensitive to medium- and long-term S deficiency, this plant species can also cope with short-term S limitation through the mobilization of endogenous S stores to maintain growth (Abdallah *et al.*, 2011), the duration of which is related to the level of leaf sulphate (SO₄²⁻) previously accumulated. Sulphate, as the most significant of the S compounds in terms of quantity, can account for from 10 to >71% of the total S in leaves of oilseed rape (Sarda *et al.*, 2014). In such conditions, oilseed rape is able to recycle endogenous S compounds (mainly as SO₄²⁻) from old and mature leaves to young leaves and roots (Dubousset *et al.*, 2009; Abdallah *et al.*, 2010). Sulphur deprivation also induces foliar up-regulation of genes encoding SO₄²⁻ transporters, such as *BnaSultr4.1* and/or *BnaSultr4.2*, which are supposed to be involved in the efflux of SO₄²⁻ from the vacuoles, as well as of root SO₄²⁻ transporters such as *BnaSultr1.1* and *1.2* (Buchner *et al.*, 2004; Kataoka *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007; Dubousset *et al.*, 2009; Abdallah *et al.*, 2010). In addition to these transcriptomic changes, Lee *et al.* (2013) have shown in *B. napus* that during the first week of S deprivation, the osmotic potential of leaves remained at a steady state level despite SO₄²⁻ mobilization, before being decreased by ~10%, suggesting a higher accumulation of osmotica and/or a reduced water content.

Under normal growing conditions, the osmotic potential of most plants is generally maintained at a steady-state level by at least two processes: (i) the differential accumulation of different osmotica in such a way that any decrease in the concentration of osmotically active compounds is compensated by the accumulation of others and (ii) the adjustment of cell water content (Burns *et al.*, 2012). Under S limitation where SO₄²⁻ is mobilized to sustain growth, it could be suggested that the reduction in its osmotic contribution must be compensated for, at least during the initial phase, by other osmotically active molecules. Such osmotic compensations aimed at keeping the leaf osmotic potential constant have already been described, for example, in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) exposed to different light intensities (Veen and Kleinendorst, 1986) and ryegrass (*L. perenne*) submitted to defoliation (Ourry *et al.*, 1989), in which NO₃⁻ was accumulated when soluble carbohydrate content was decreased (and vice versa). Likewise, in lettuce (*Lactuca sativa*) NO₃⁻ was also accumulated to compensate for a reduced content of soluble organic compounds resulting from low light conditions (Burns *et al.*, 2011a). The late decrease in osmotic potential previously reported under S limitation in oilseed rape (Lee *et al.*, 2013) could also be a result of metabolic disorders such as amino acid accumulation and subsequent inhibition of N metabolism.

The main objectives of this work were to (i) determine the effects of S deprivation on leaf osmotic potential and (ii) identify the mineral and/or organic compounds that contribute osmotically during SO₄²⁻ mobilization. In order to differentiate osmotic causes from metabolic perturbations, the impact of S deprivation on osmotic potential was also compared to chlorine (Cl) deprivation. Indeed, Cl as a free anion participates in compensation and osmoregulation in the whole plant (Xu *et al.*, 2000), but in contrast to SO₄²⁻,

which is assimilated, only a few chlorinated organic compounds have been identified in higher plants (Broadley *et al.*, 2012). Additionally, kinetic analysis of anions, cations and organic compounds (amino acids, organic acids, soluble carbohydrates) and their osmotic contribution were quantified together with NO_3^- uptake and assimilation. Finally, the last objective was to identify early events during S deprivation, just prior to growth reduction, and with kinetics close to the induction of SO_4^{2-} transporters that could be potentially usable under field conditions as indicators of S nutrition levels.

Materials and methods

Hydroponic experiments and applications of restricted S and Cl supply

Seeds of *Brassica napus* L. var. Boheme were germinated on perlite over demineralized water for 7 d in the dark and then 5 d under natural light. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to hydroponic conditions (18 seedlings per 20 l plastic tank) in a greenhouse, between October and December, with a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night). Natural light was supplemented with high-pressure sodium lamps (MASTER GREENPOWER T400W, Philips, Amsterdam, Netherlands) ($350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation at the canopy height) for 16 h. The aerated nutrient solution contained: 3.75 mM KNO_3 , 0.5 mM MgSO_4 , 0.5 mM CaCl_2 , 0.25 mM KH_2PO_4 , 0.2 mM EDTA, 2 NaFe, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM CuSO_4 , 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.1 μM CoCl_2 , 0.04 μM NiCl_2 and buffered to pH 6.6 with 0.91 mM CaCO_3 . This solution was renewed according to the rate of NO_3^- uptake by monitoring the NO_3^- level in the tank with a NO_3^- test strip so as to maintain optimal conditions for growth for non-vernalized rosette plants (i.e. vegetative stage: *Bna*).

After four weeks of growth, plants were separated into three batches supplied with a modified nutrient solution chosen in order to maintain the same concentration of each nutrient (Table 1): (i) control plants (control) were grown with 508.7 μM SO_4^{2-} and 1 mM Cl^- , (ii) S limited plants (-S) were grown with 8.7 μM SO_4^{2-} , and (iii) Cl limited plants (-Cl) with 0.28 μM Cl^- . Nutrient solutions were renewed also according to NO_3^- uptake by monitoring the NO_3^- level in the tank (at the end of experiment this was about every 2 d). At this date (corresponding to day 0), overall treatments were continuously labelled with K^{15}NO_3 (0.22544 $^{15}\text{NO}_3\%$ excess).

Tissue sampling

Four independent samples each consisting of four individual plants were harvested at day 0 and after 1, 2, 3, 7, 13, 21 and 28 days of treatment. Leaves and petioles present at the beginning of treatment applications (d0) were identified and marked, and these organs were referred to as 'emerged leaves' and 'emerged petioles', with leaves and petioles appearing during treatments as 'new emerging leaves' and 'new emerging petioles'. At each date of harvest, whole roots from control and depleted plants (-S and -Cl) were harvested.

Thereafter, leaves, petioles and roots were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis. An aliquot of each tissue was freeze-dried for dry weight (DW) determination and ground, using an oscillating grinder (MM400, Retsch, Haan, Germany), to fine powder for mineral, ion and amino acid analysis. Likewise, at each time of harvest, a fresh aliquot of leaves and roots was used for real-time *in vivo* nitrate reductase (NR) activity and osmotic potential measurement.

Measurement and calculation of water content and osmotic potential

Leaf water content was estimated by weighing ten leaf discs (\varnothing 18 mm) immediately after harvest and after drying for 48 h at 60°C. The osmotic potential of cell sap was determined, using a cryoscopic osmometer (Roebbling osmometer automatik, Bioblock Scientific, Illkirch, France). Ten leaf discs (\varnothing 18 mm) were collected for analysis from the middle part of leaves and were placed in a syringe, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. After thawing, the cell sap was pressed out of a syringe, collected and centrifuged at 10 000 $\times g$ for 10 min at 4°C. The corresponding supernatant was used for osmotic potential measurements. The osmotic potential (MPa) of leaf cells was then calculated according to the Van't Hoff equation: $\pi = (-R \times T \times \text{osmolality of the extract})$, where T is the absolute temperature and R is the constant of perfect gas.

Anion and cation analysis

Ions were extracted from 30 mg of freeze-dried plant material and were initially mixed with 1.5 ml of 50% ethanol solution. After incubation at 40°C for 1 h, the extract was centrifuged at 12 000 $\times g$ for 20 min and the supernatant was collected. This step was repeated on the pellet and the resulting supernatant obtained was pooled with the previous one. All these operations (i.e. incubation and centrifugation) were repeated twice, but with 1.5 ml of ultra-pure water and incubation at 95°C. All the supernatants were pooled and evaporated under vacuum (Concentrator Evaporator RC 10.22, Jouan,

Table 1. Composition of the three nutrient solutions used for control, S or Cl deprivation during the treatment period (28 days)

Nutrient concentrations are expressed in mM.

Nutrients	Control	S deprivation (-S)	Cl deprivation (-Cl)
K^{15}NO_3	3.75	3.75	3.75
KH_2PO_4	0.25	0.25	0.25
EDTA, 2NaFe	0.20	0.20	0.20
MgSO_4	0.50	0	0.50
CaCl_2	0.50	0	0
MgCl_2	0	0.50	0
CaCO_3	0.91	1.41	1.41
H_3BO_3	1.4×10^{-2}	1.4×10^{-2}	1.4×10^{-2}
MnSO_4	5×10^{-3}	5×10^{-3}	5×10^{-3}
ZnSO_4	3.3×10^{-2}	3.3×10^{-2}	3.3×10^{-2}
CuSO_4	7×10^{-4}	7×10^{-4}	7×10^{-4}
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	7×10^{-4}	7×10^{-4}	7×10^{-4}
CoCl_2	1×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-4}
NiCl_2	4×10^{-5}	4×10^{-5}	4×10^{-5}

Saint-Herblain, France). The dry residue was resuspended in 1.5 ml of ultra-pure water and was filtered on 45 µm filters.

Thereafter, anion and cation contents were determined using high performance liquid chromatography with a conductivity detector (ICS3000 and ICS5000+, Thermo Scientific-Dionex, Villebon-sur-Yvette, France) for anion and cation analysis, respectively. The eluent solution for anion analysis consisted of 4.05 mM Na₂CO₃ and 1.26 mM NaHCO₃ and was pumped isocratically over an analytical column (AS22 4*250 mm). For cation analysis, the eluant consisted of 20 mM methanesulfonic acid and was pumped isocratically over an analytical column (CS12A 4*250 mm).

Amino acid, organic acid and non-structural carbohydrate analysis

For amino acid extraction, 20 mg of freeze-dried plant material with 1 ml of distilled water were agitated at 2000 rpm for 30 min (Multi Reax, Heidolph Instruments, Schwabach, Germany) and centrifuged at 13 000 ×g for 5 min and then the supernatant was collected. The pellet was re-extracted twice by adding 0.5 ml of distilled water, shaking for 15 min and centrifuging at 13 000 ×g for 5 min. All the supernatants were pooled and purified by solid phase extraction. Derivatizations were performed with an EZ:faast LC/MS Physiological Free Amino Acids Kit (KHO-7338, Phenomenex, Torrance, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Thereafter, amino acid contents were determined using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) (Waters Alliance HT, Milford, MA, USA) equipped with a separation module (2795 XE, Phenomenex, Torrance, CA, USA), a temperature controller (ALLCOLHTR, Phenomenex, Torrance, CA, USA) and a column (EZ:faast AAA-MS 250*3.0 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Chromatographic separation of amino acids was achieved using a 0.50 ml min⁻¹ flow rate and a 10 mM ammonium formate in water (A)/10 mM ammonium formate in methanol (B) gradient profile as follows: time 0, 68% of B; time 13 min, 83% of B; time 13.01 min, 83% of B; time 17 min, 68% of B; time 20 min, 68% of B. Amino acids were detected using a 3200 QTRAP LC/MS/MS system (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada), equipped with a turbo spray interface working in positive mode. Quantification was performed using multiple reaction monitoring and applying the internal standard method with homoarginine, d₃ methionine, homophenylalanine, d₃ tryptophan, d₃ cysteine, [¹³C]alanine, [¹⁵N]aspartic and [¹⁵N]glycine as internal standards.

The procedure for organic acid and non-structural carbohydrate analysis has been described in detail by Fiehn (2006).

Calculation of contribution of solutes to the osmotic potential

Contribution of mineral solutes (SO₄²⁻, Cl⁻, PO₄³⁻, NO₃⁻, K⁺, Mg²⁺, Na⁺) and organic solutes [grouped by biochemical families: total amino acids (AAs), total organic acids (OAs), total non-structural carbohydrates (NSCs)] to the osmotic potential was obtained by converting the data to MPa, according to the Van't Hoff equation. The cumulative osmotic potential is obtained by summing the calculated contributions of each solute and the difference between measured and calculated values of osmotic potential corresponding to un-quantified compounds (Ca²⁺ has not been taken into account in the calculation of the contribution to osmotic potential). Finally, conversion to MPa implicated the water parameters (fresh and dry weight), so they were included in this representation of the cumulative osmotic potential.

S, N and ¹⁵NO₃ analysis

An aliquot of each freeze-dried plant organ (roots, emerged petioles and leaves, new emerging petioles and leaves) was placed into tin capsules for isotopic analysis. The total N and S contents and ¹⁵NO₃ excess were determined with a continuous flow isotope ratio

mass spectrometer (Horizon, NU Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy).

The total S (Stot) amount of an organ 'i' at a given time 't' was calculated as: $Stot_{i,t} = \%S_{i,t} \times DW_{i,t} / 100$. As for S, the total N (N_{tot}) amount in compartment 'i' at a given time 't' was calculated as: $Ntot_{i,t} = (\%N_{i,t} \times DW_{i,t}) / 100$. The mean ¹⁵NO₃ abundance in unlabelled plants at d0 (0.35451 ± 0.00026%) was used as a reference for ¹⁵NO₃ analysis. Nitrogen derived from current uptake (Nupt_{i,t}) was calculated as: $Nupt_{i,t} = (Ntot_{i,t} \times E_{i,t}) / E_s$, where E_{i,t} (%) is the atom ¹⁵NO₃ excess in compartment i at a given time, and E_s is the nutrient solution atom ¹⁵NO₃ excess (0.22544 ± 0.0003%).

In vivo NR activity in plants

The NR activity was determined using an *in vivo* assay adapted from Bungard *et al.* (1999). Shoot tissue (0.2 g fresh weight) was vacuum infiltrated for 3 × 30 s with 10 ml of phosphate buffer (pH 7.5) containing 3% (v/v) propanol and 1.36 M KNO₃. After vacuum infiltration, buffer solutions containing plant material were separated into two sets. One part was incubated in a shaking water bath at 30°C for 20 min in darkness and then boiled to stop any enzymatic activity. The other part was boiled immediately after vacuum infiltration for initial nitrite concentration determination. The colorimetric reaction was performed with 2 ml of plant extract, 1 ml of 0.5% (w/v) sulfanilic acid in 50% acetic acid and 1 ml of 0.2% (w/v) α-naphthylamine in 50% acetic acid. The concentration of nitrite (NO₂⁻) in each buffer solution was measured with a spectrophotometer (SmartSpec plus spectrophotometer, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) at 540 nm. Thereafter, NR activity was calculated as micromole NO₂⁻ formed per gram DW and per hour, corresponding to micromole NO₃⁻ reduced per gram DW and per hour.

RNA extraction

Total RNA was extracted from 200 mg of root and leaf fresh matter. Frozen samples were ground to a powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in 750 µl of extraction buffer [0.1 M TRIS, 0.1 M LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS (w/v), pH 8] and 750 µl of hot phenol (80°C, pH 4.3). This mixture was vortexed for 40 s and after addition of 750 µl of chloroform:isoamylalcohol (24/1: v/v) the homogenate was centrifuged at 15 000 g for 5 min at 4°C. The supernatant was transferred into 750 µl of 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation 15 000 ×g for 20 min at 4°C, the pellet was suspended in 100 µl of sterile water. RNA was then purified with an RNeasy mini kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantification of total RNA was performed by spectrophotometry at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before reverse transcription (RT) and real-time PCR (q-PCR) analyses.

Reverse transcription and q-PCR analyses

For RT, 1 µg of total RNA was converted to cDNA with an iScript cDNA synthesis kit according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Q-PCR amplifications were performed using specific primers for each housekeeping gene (*EF1-α* and *18S rRNA*) and target genes (*BnaNrt1.1*, *BnaNrt2.1*, *BnaSultr1.1*, *BnaSultr1.2*, *BnaSultr4.1*, *BnaSultr4.2*, and *BnaClCa*: Table 2).

Q-PCRs were performed with 4 µl of 100× diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1× SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) in a real-time thermocycler (CFX96 Real Time System, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). A three steps program, composed of an activation step at 95°C for 3 min and 40 cycles of a denaturing step at 95°C for 15 s followed by an annealing and extending step at 60°C for 40 s, was used for all pairs of primers (Table 2). For each pair of primers, a threshold value and

Table 2. Accession number and Q-PCR primer sets

EF1- α and *18S rRNA* were housekeeping genes used for relative gene expression by Q-PCR analysis.

Gene	Accession number	Forward	Reverse
<i>EF1-α</i>	DQ312264	5'-gcctggatggttgacct-3'	5'-gaagtagcagcaccctgg-3'
<i>18S rRNA</i>	X16077	5'-cggataaccgtagtaattctag-3'	5'-gtactcattccaattaccagac-3'
<i>BnaSultr1.1</i>	AJ416460	5'-agatattgcgatcgaccag-3'	5'-gaaaacgccagcaagaag-3'
<i>BnaSultr1.2</i>	AJ311388	5'-ggtgtagtcgctggaatggt-3'	5'-aacggagtgaggagagcaa-3'
<i>BnaSultr4.1</i>	AJ416461	5'-gaccagaccggttaaggtca-3'	5'-ttggaatccatggaagcaa-3'
<i>BnaSultr4.2</i>	FJ688133	5'-agcaagatcaggatgtgg-3'	5'-tgaacattgtgggtgtct-3'
<i>BnaNrt1.1</i>	AJ278966	5'-tggtggaatagcggctcgagttg-3'	5'-gtatacgtttgggtcattgcat-3'
<i>BnaNrt2.1</i>	AJ293028	5'-atggaaccgaagtccttg-3'	5'-tgattccagctgtggaagc-3'
<i>BnaClCa</i>	GU724876	5'-gtcagcttcagatcaccg-3'	5'-ttaccgaagagcccattt-3'

PCR efficiency was determined using a cDNA preparation diluted >10-fold. For all pairs of primers, PCR efficiency was ~100%. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after q-PCRs and by sequencing the q-PCR product to confirm that the correct amplicon was produced from each pair of primers (Eurofins, Ebersberg, Germany). For each sample, the subsequent q-PCRs were performed in triplicate. The relative expression of the genes in each sample was compared with the control sample (corresponding to control plants at d0) and was determined with the delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) method using the following equation: relative expression = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, with $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}}$ and with $\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}$ (for calculations, the geometric mean was considered between Ct of the housekeeping genes), where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification. Using this analysis method, relative expression of the target gene in the control sample was equal to one (Livak and Schmittgen, 2001), and the relative expression of other treatments was then compared with the control.

Statistical analysis

For each measurement, experiments were conducted with four independent biological replicates constituted of four individual plants, except for q-PCR analysis, which was conducted with three biological replicates. Data are given as mean \pm SE for $n=4$ (or $n=3$ for q-PCR data). All data were analysed by Student's test (Excel software) and marked by one or several asterisks when significantly different (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

Results

Growth and osmotic potential were affected by S deprivation

To characterize the effect of S deprivation on rapeseed growth and metabolism, plants were grown with an optimal solution for four weeks, and then supplied (d0) with a modified nutrient solution with (control) or without sulphur (-S) for 28 days. At day 0, shoot and root biomass for control plants were 3.42 ± 0.13 and 0.65 ± 0.02 g DW plant⁻¹, respectively, and after 28 days reached 37.24 ± 2.11 and 5.51 ± 0.79 g DW plant⁻¹ (Fig. 1A, B). Compared to control plants, S-deprived plants (-S) were characterized by a significant decrease in root and shoot dry weights after only 7 and 13 days of treatment, respectively. This effect was more pronounced after 28 days of -S treatment, as root growth was reduced by about 20% (4.41 ± 0.15 g DW plant⁻¹ for S-deprived plants versus

5.51 ± 0.40 g DW plant⁻¹ for control plants after 28 days) and shoot growth by 40.5% (from 37.24 ± 2.11 for control plants to 22.15 ± 1.66 g DW plant⁻¹ for S-deprived plants after 28 d). This growth reduction was stronger in new emerging leaves and petioles (Fig. 1C) that appeared during S deprivation than in emerged leaves and petioles that appeared prior to the treatment (Fig. 1D). Indeed, at the end of the experiment, the growth of new emerging leaves and petioles had reduced by 58.7% and in previously emerged leaves and petioles the growth reduction was only 13%.

Fig. 2 presents the influence relative to control plants of S deprivation on the osmotic potential (Fig. 2A) and water content (Fig. 2B) of new emerging and emerged leaves. The osmotic potential in control plants for new emerging leaves varied between -0.93 and -1.02 MPa (Fig. 2A) and water content remained at a steady level, between 87 and 88% (Fig. 2B). In contrast, S deprivation strongly reduced the osmotic potential of new emerging leaves (Fig. 2A) at all times with a maximum reduction of 34% after 28 days. In parallel, water content (Fig. 2B) was significantly reduced at 21 and 28 days but this accounted for only 8 and 15% of the total drop in osmotic potential, respectively. The osmotic potential of emerged leaves remained stable and similar to control plants during the first 13 days of S deprivation, and was then significantly reduced after 21 days by about 13% alongside a significant diminution of water content (Fig. 2B), which accounted for only 16% of the total drop in osmotic potential. As a consequence, during exposure to S deprivation, the early steady state level of leaf osmotic potential would be the result of an osmotic compensation for the disappearance of SO_4^{2-} , while the late decrease in leaf osmotic potential could probably be explained by a limited loss of water coupled with an increase in solute accumulation.

Changes in osmotic potential during S deprivation were due to a significant accumulation of mineral and organic solutes

Regardless of which leaves were examined, SO_4^{2-} content (Fig. 3A) steadily increased with time in control plants. Predictably and according to deprivation, in emerged leaves from S-deprived plants the SO_4^{2-} content (Fig. 3A) significantly decreased as early as 3 days after S deprivation. In parallel,

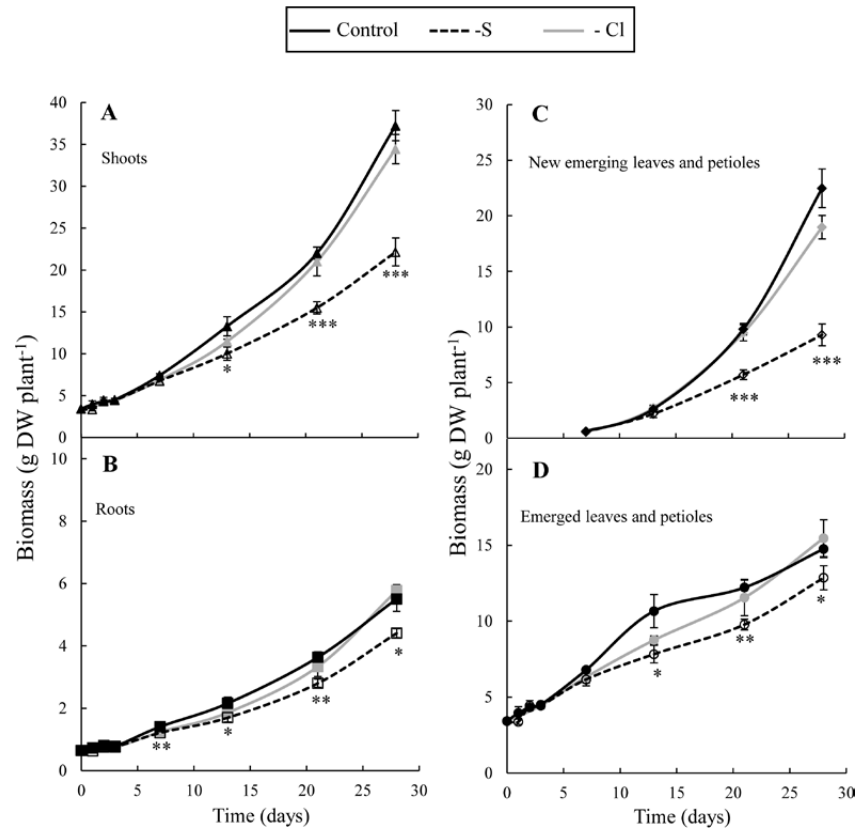


Fig. 1. Kinetic evolution of biomass (g DW plant⁻¹) of (A) shoots, (B) roots, (C) new emerging and (D) emerged leaves and petioles of *Brassica napus* from control (black line), S-deprived (-S, dashed line) or Cl-deprived (-Cl, grey line) plants during the 28 days of the treatment. Data are given as the mean \pm SE (n=4). Asterisks indicate significant differences from control at a given date for $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) or $P < 0.001$ (***).

only traces of SO_4^{2-} (Fig. 3A) were found in new emerging leaves from S-deprived plants ($< 0.5 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ DW}$, Fig. 3A). More surprisingly, the accumulation of other anions was also affected by S deprivation. For example, the Cl^- content (Fig. 3B) was significantly higher than in control plants, whichever leaves were tested during the first 13 days of S deprivation. Phosphate content (Fig. 3C) was increased by S deprivation by 42% at 13 days in new emerging leaves and in emerged leaves the PO_4^{3-} content increased significantly only during the first 3 days (Fig. 3C). Similarly, NO_3^- content (Fig. 3D) was increased by S deprivation in both groups of leaves, with an increase of 40% at 13 days in new emerging leaves.

Cation concentrations were also quantified in leaves (Fig. 4). The Na^+ content (Fig. 4A) was significantly lowered in emerged leaves from S-deprived plants. Potassium content (Fig. 4B) remained at a nearly steady state level in control plants, but was significantly lowered by S deprivation, whichever leaves were tested. For example, after 28 days of -S treatment, K^+ content was reduced by 37% in emerged leaves and by 22% in new emerging leaves. Sulphur deprivation had no effect on the Mg^{2+} content (Fig. 4C) in emerged leaves and induced a significant increase in the Mg^{2+} content after 7 and 13 days in new emerging leaves alone. The Ca^{2+} content (Fig. 4D) was significantly increased with time in control plants, and this was also the case for S-deprived plants but at a significantly lower level.

The contents of AAs, OAs and NSCs were estimated as the sum of individually quantified compounds, as described in

the experimental procedures. During the early stages of the experiment (i.e. up to 7 days of S deprivation), no major differences were observed for total AAs content between control and -S plants in emerged leaves (Fig. 5A). However, from 13 days of S deprivation, AAs showed a striking accumulation in emerged leaves. The same accumulation of AAs was observed even sooner in new emerging leaves (from 7 days of -S treatment), the AAs content being increased by 347% at day 21. The OAs content (Fig. 5B) in leaves was unaffected by S deprivation. The NSCs content of new emerging leaves was significantly lower in S-deprived plants than in control plants (Fig. 5C), while in emerged leaves they were highly variable during the treatment period. For example, in emerged leaves from S-deprived plants the NSCs content was similar to control plants, except at 13 and 28 days where it was lower and higher, respectively, than in control plants.

Contribution to osmotic potential of Cl^- , NO_3^- and PO_4^{3-} in compensating for the disappearance of SO_4^{2-} during S deprivation

The osmotic potential of emerged leaves at day 0 was measured and the relative contribution of mineral solutes (SO_4^{2-} , Cl^- , PO_4^{3-} , NO_3^- , K^+ , Mg^{2+} , Na^+) and of the main organic solutes (grouped by biochemical families: NSCs, OAs, AAs) was calculated (Fig. 6A), as described in the experimental procedures. At day 0, the main osmotic contributions to the

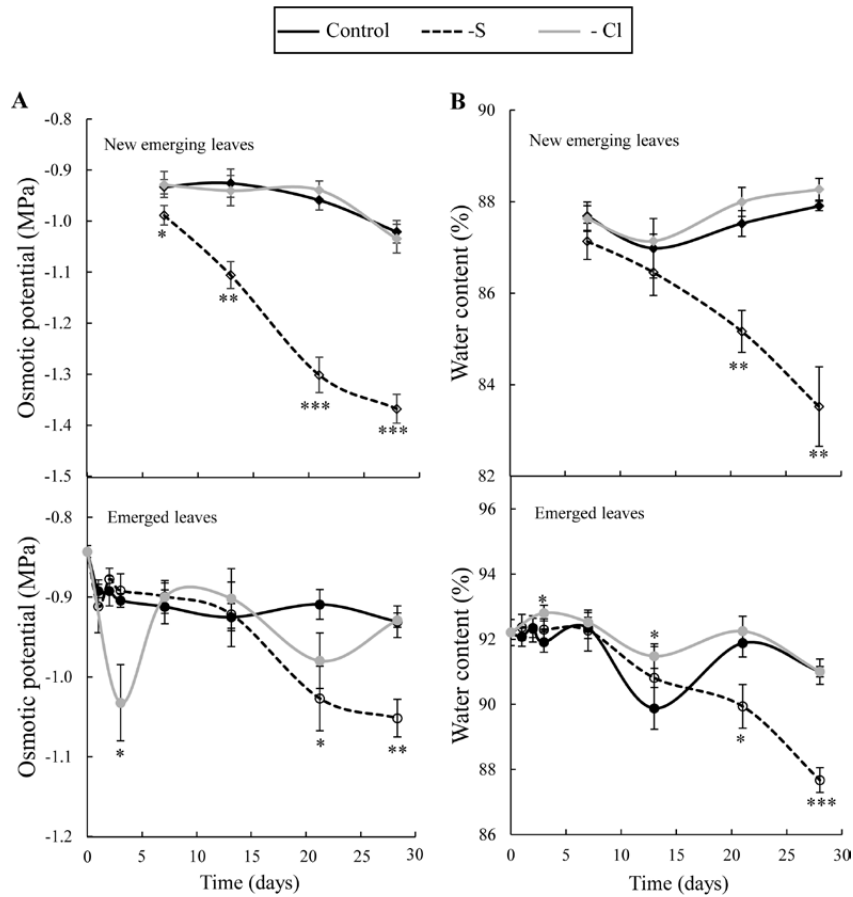


Fig. 2. (A) Osmotic potential (Mpa) and (B) water content (%) of new emerging and emerged leaves of *Brassica napus* from control (black line), S-deprived (-S, dashed line) or Cl-deprived (-Cl, grey line) plants during the 28 days of the treatment. Data are given as the mean \pm SE ($n=4$). Asterisks indicate significant differences from control at a given date for $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**) or $P<0.001$ (***).

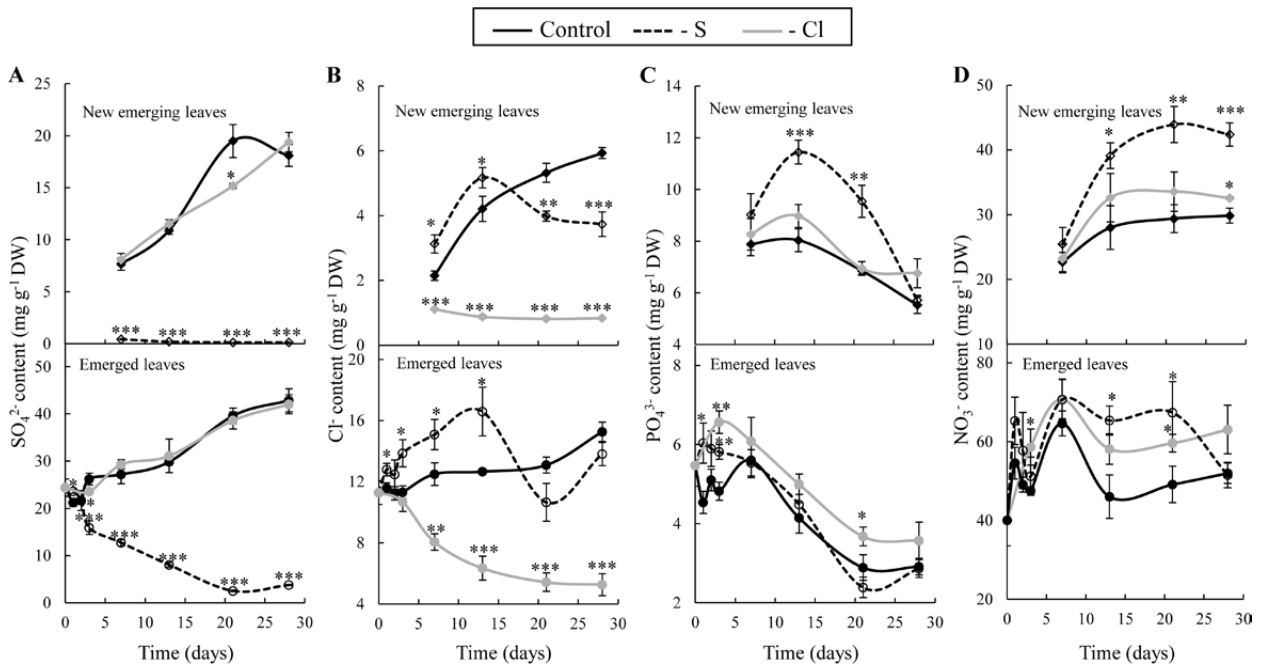


Fig. 3. Kinetic evolution of (A) SO₄²⁻, (B) Cl⁻, (C) PO₄³⁻ and (D) NO₃⁻ contents (mg g⁻¹DW) in new emerging and emerged leaves of *Brassica napus* from control (black line), S-deprived (-S, dashed line) or Cl-deprived (-Cl, grey line) plants during the 28 days of the treatment. Data are given as the mean \pm SE ($n=4$). Asterisks indicate significant differences from control at a given date for $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**) or $P<0.001$ (***).

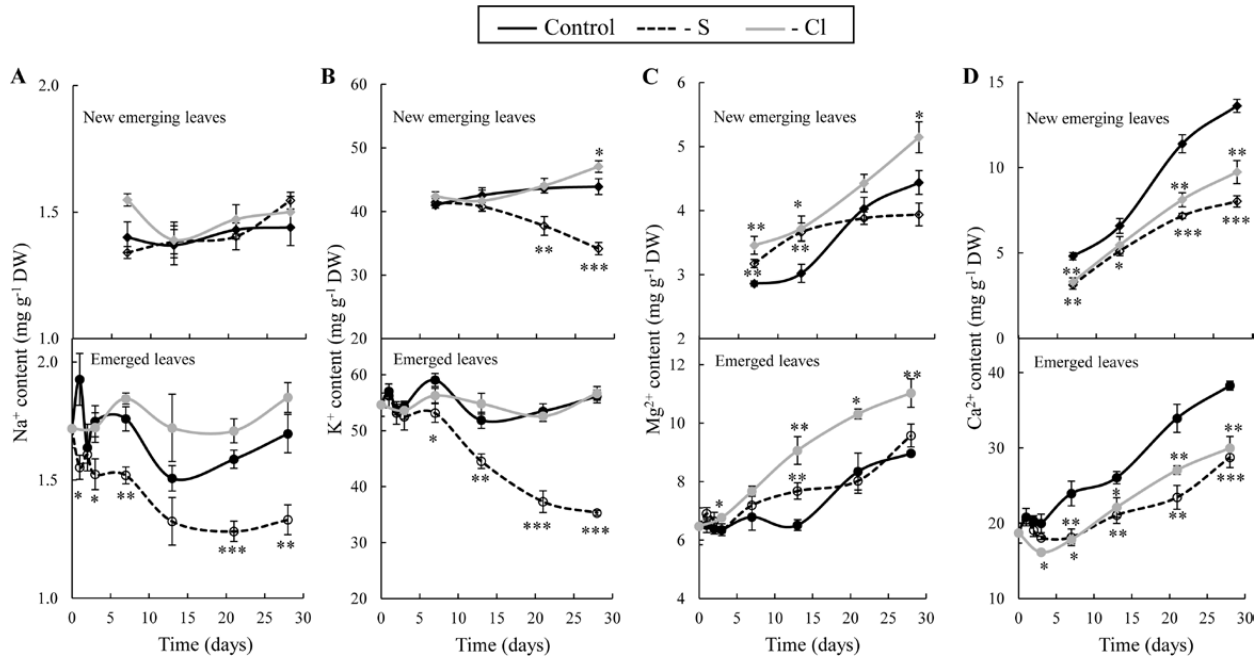


Fig. 4. Kinetic evolution of (A) Na^+ , (B) K^+ , (C) Mg^{2+} and (D) Ca^{2+} contents ($\text{mg g}^{-1}\text{DW}$) in new emerging and emerged leaves of *Brassica napus* from control (black line), S-deprived (-S, dashed line) or Cl-deprived (-Cl, grey line) plants during the 28 days of the treatment. Data are given as the mean \pm SE ($n=4$). Asterisks indicate significant differences from control at a given date for $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**) or $P<0.001$ (***).

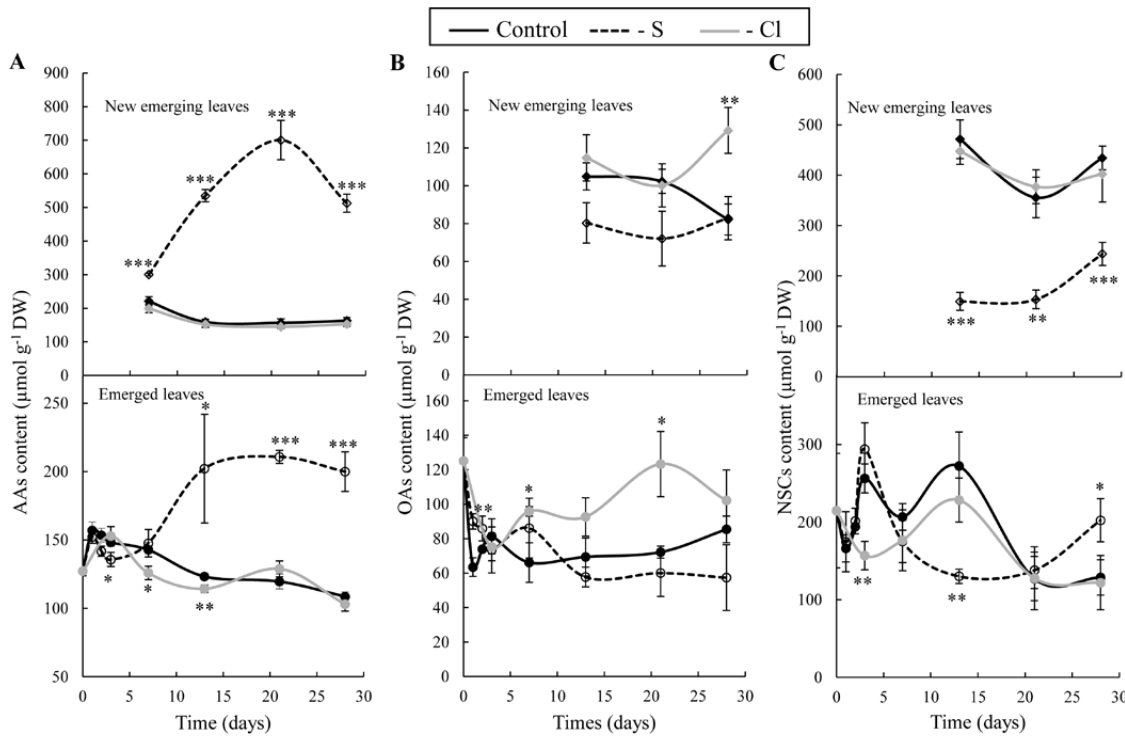


Fig. 5. Kinetic evolution of (A) total amino acid (AAs), (B) total organic acid (OAs) and (C) total non-structural carbohydrate (NSCs) contents ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{DW}$) in new emerging and emerged leaves of *Brassica napus* from control (black line), S-deprived (-S, dashed line) or Cl-deprived (-Cl, grey line) plants during the 28 days of the treatment. Data are given as the mean \pm SE ($n=4$). Asterisks indicate significant differences from control at a given date for $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**) or $P<0.001$ (***).

measured osmotic potential of emerged leaves were found for K^+ (34.6%), NO_3^- (15.8%) and Cl^- (7.9%) followed by SO_4^{2-} (6.3%), Mg^{2+} (6.6%) and NSCs (6.4%). The osmotic contribution of organic acids, AAs, Na^+ and PO_4^{3-} remained

lower than 3.6% while unquantified compounds reached 12.4%. Potassium was the major contributor to the osmotic potential, but it remained at a steady state level in control and S-deprived plants throughout the treatment period

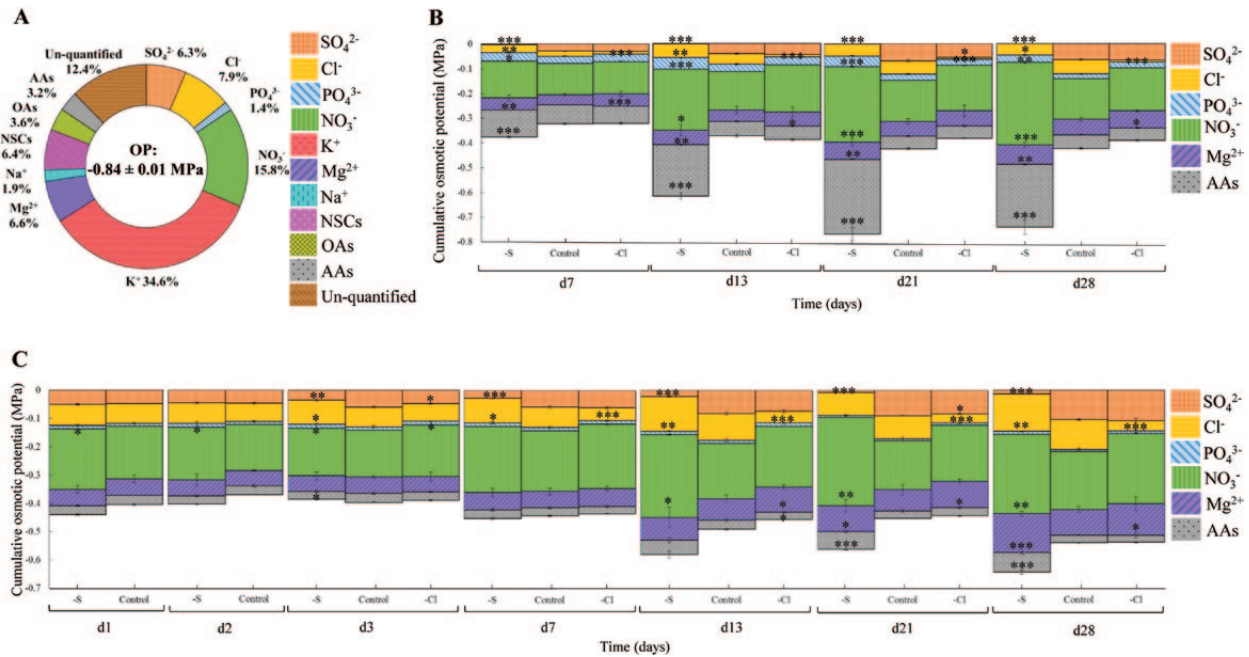


Fig. 6. (A) Contributions as % to measured osmotic potential (OP) of mineral (SO_4^{2-} , Cl^- , PO_4^{3-} , NO_3^- , K^+ , Mg^{2+} and Na^+) and organic solutes [total non-structural carbohydrates (NSCs), total organic acids (OAs) and total amino acids (AAs)] of emerged leaves at d0 from control plants. Unquantified solutes correspond to the difference between measured and calculated values of osmotic potential. Cumulative osmotic potential (Mpa) in (B) new emerging leaves and (C) in emerged leaves of *Brassica napus* from control, S-deprived (-S) or Cl-deprived (-Cl) plants during the 28 days of the treatment. At each time of treatment, cumulative osmotic potential, calculated in MPa was the result of the sum of the individual contribution of five mineral solutes (SO_4^{2-} , Cl^- , PO_4^{3-} , NO_3^- , Mg^{2+}) and AAs, which were significantly affected by S or Cl deprivation. Vertical bars indicate \pm SE ($n=4$) while asterisks inside each histogram indicate significant differences from control at a given date for $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**) or $P<0.001$ (***). (This figure is available in colour at JXB online.)

($P>0.05$), except at 28 days in S-deprived plants (data not shown). Therefore, K^+ did not seem to play a major role in osmoregulation. Thus, Fig. 6B and C only considered the osmotic contributions of mineral and organic solutes that were significantly affected by S or Cl deprivation. In new emerging leaves (Fig. 6B), the lack of SO_4^{2-} accumulation and hence its reduced osmotic contribution was fully compensated by an accumulation of NO_3^- , PO_4^{3-} and Cl^- (except after 21 days). In the meantime, the increasing osmotic role of AAs (up to -0.25 MPa) may largely explain the reduction of measured osmotic potential (Fig. 2, maximum of -0.35 MPa between control and S-deprived plants). Finally, an increase in the osmotic contribution of one cation, Mg^{2+} , occurred in new emerging leaves during S deprivation. In emerged leaves (Fig. 6C), SO_4^{2-} was mobilized from the third day of S deprivation, while the osmotic potential measured remained stable and similar to control plants during the first 13 days of S deprivation (Fig. 2A) and was significantly reduced only after 21 days. This steady level of emerged leaf osmotic potential was therefore the result of compensation by the accumulation of other solutes. Indeed, a significant increase in the osmotic contribution of PO_4^{3-} occurred during the first 3 days, a smaller increase in Cl^- also occurred during the first 2 days, and then from 3 to 28 days the osmotic contribution of Cl^- was significantly increased compared to control plants (Fig. 6C). In emerged leaves of S-deprived plants, the osmotic contributions of NO_3^- and Mg^{2+} were higher than in control plants over the 28 days but only significant after 13 and 21 d for the two

ions respectively. In parallel, compared to control plants, the osmotic contribution of AAs was significantly increased in S-deprived plants after 21 days. Finally, during S deprivation, the disappearance of SO_4^{2-} was osmotically compensated by an enhancement of PO_4^{3-} , Cl^- and NO_3^- contents. Later on, the fall in osmotic potential of the two groups of leaves (i.e. d7, d13, d21 and d28 in new emerging leaves; d21 and d28 in emerged leaves) could be due to an increased contribution of Mg^{2+} , but this is more likely due to AAs. In the latter case, this could be the result of metabolic disturbances caused by S deprivation together with a lack of internal SO_4^{2-} availability.

Nitrogen metabolism was affected after 13 days of S deprivation

In S-deprived plants, the cumulated $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake was significantly lower than in controls from 13 days to 28 days and it was reduced by 24% and 45% after 13 and 28 days, respectively (Fig. 7A). After 13 days of S deprivation and until the end of the experiment, the NO_3^- reductase activity was strongly decreased in the two groups of leaves. Compared to control plants, the NR activity in emerged leaves was reduced by 41% at 28 days of -S treatment. The reduction in NR activity was more pronounced in new emerging leaves, where it was decreased by 60% after 28 days of S deprivation (Fig. 7B). Overall, S deprivation reduced NO_3^- uptake and NR activity after 13 days of treatment, by which growth was reduced (Fig. 1) and AAs had been accumulated (Fig. 5A).

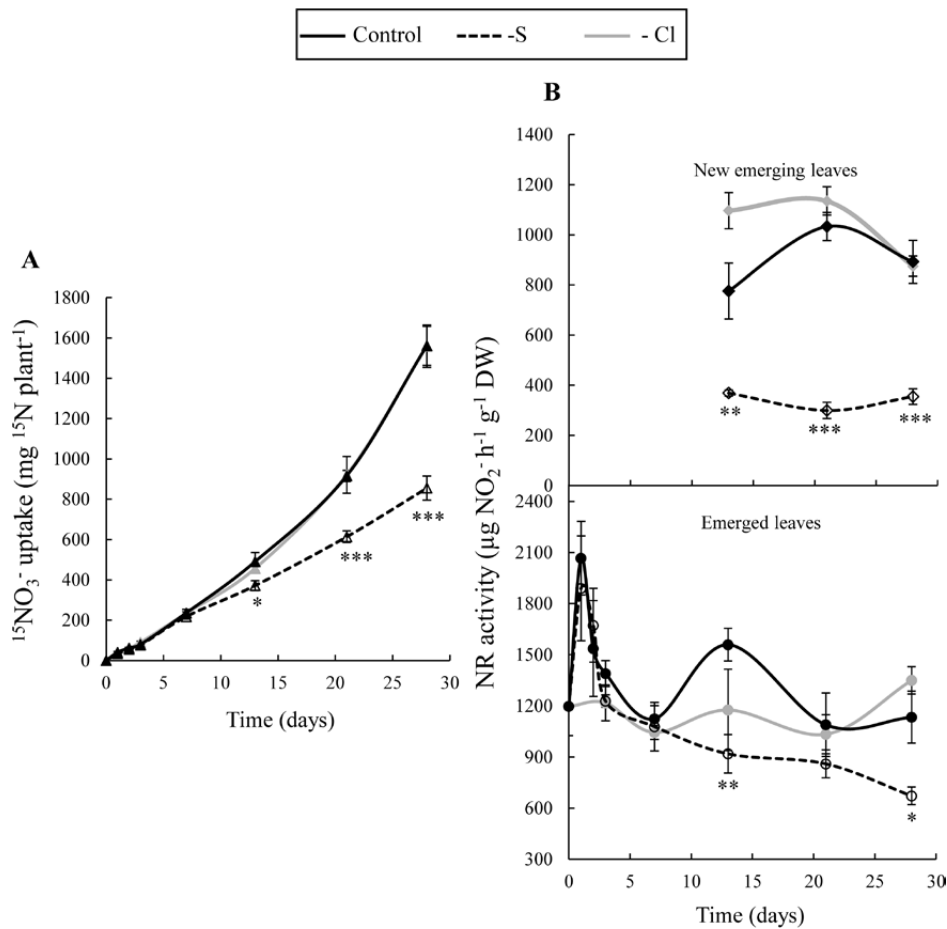


Fig. 7. (A) Cumulated NO_3^- uptake by control (black line), S-deprived (-S, dashed line) and Cl-deprived (-Cl, grey line) plants, and (B) *in vivo* NR activity in new emerging leaves and emerged leaves of *Brassica napus* from control (black line), S-deprived (-S, dashed line) or Cl-deprived (-Cl, grey line) plants during the 28 days of the treatment. Data are given as the mean \pm SE ($n=4$). Asterisks indicate significant differences from control at a given date for $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**) or $P<0.001$ (***)

In order to better characterize the effect of S deprivation on *Brassica napus* N and S metabolisms, the relative expression of genes encoding different SO_4^{2-} (*BnaSultr1.1* and *BnaSultr1.2*, *BnaSultr4.1*, *BnaSultr4.2*) and NO_3^- (*BnaNrt1.1*, *BnaNrt2.1* and *BnaClCa*) transporters was quantified by qPCR analysis in the emerged leaves, new emerging leaves and/or in the roots, during the kinetics of the 28 days. The expression of the root transporters, *BnaSultr1.1* and *BnaSultr1.2* involved in SO_4^{2-} uptake was up-regulated from the first day in response to S deprivation (Fig. 8A). The expression of the vacuolar SO_4^{2-} transporters, *BnaSultr4.1* and *BnaSultr4.2*, was also up-regulated within less than 2 days of S deprivation in emerged leaves (Fig. 8A), roots and in new emerging leaves (data not shown), with the induction of *BnaSultr4.2* being higher than *BnaSultr4.1* in each organ. In parallel, expression of the root NO_3^- transporter, *BnaNrt1.1*, was similar in S-deprived and control plants, whereas *BnaNrt2.1* was repressed between 7 and 13 days of S deprivation (Fig. 8B). Finally, the *ClCa* gene encoding a vacuolar NO_3^- transporter in *Arabidopsis thaliana* and functioning as a $2\text{NO}_3^-/1\text{H}^+$ exchanger that facilitates NO_3^- accumulation in the vacuole, was not affected during the 28 days of S deprivation (Fig. 8B).

Compared to S deprivation, Cl deprivation affected only mineral and organic solute contents

To compare S and Cl deprivation at the same time and in the same way as S deprivation, Cl-deprived plants were obtained with the application of an optimal solution for four weeks, and then a modified nutrient solution without chlorine (-Cl) for 28 days. Compared to control plants, and in contrast to the findings for S deprivation, Cl deprivation did not significantly reduce shoot (Fig. 1A, C, D) and root biomass (Fig. 1B), nor did it change whole plant $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake (Fig. 7A), leaf NR activity (Fig. 7B), SO_4^{2-} (Fig. 3A), Na^+ (Fig. 4A), K^+ (Fig. 4B), AA (Fig. 5A) and NSC contents (Fig. 5C), leaf osmotic potential (Fig. 2A) or water content (Fig. 2B). While leaf Cl $^-$ content steadily increased with time in control plants (Fig. 3B), it decreased during Cl deprivation in emerged leaves after 7 days. In new emerging leaves, $<1.2 \text{mg Cl}^- \text{g}^{-1} \text{DW}$ were found in Cl-deprived plants (Fig. 3B). Only PO_4^{3-} in emerged leaves (Fig. 3C, significant for the first 3 days) and NO_3^- in both groups of leaves (Fig. 3D, which was a general trend but significant for only a few time points) reached higher contents than in control plants. Leaf Mg^{2+} content (Fig. 4C)

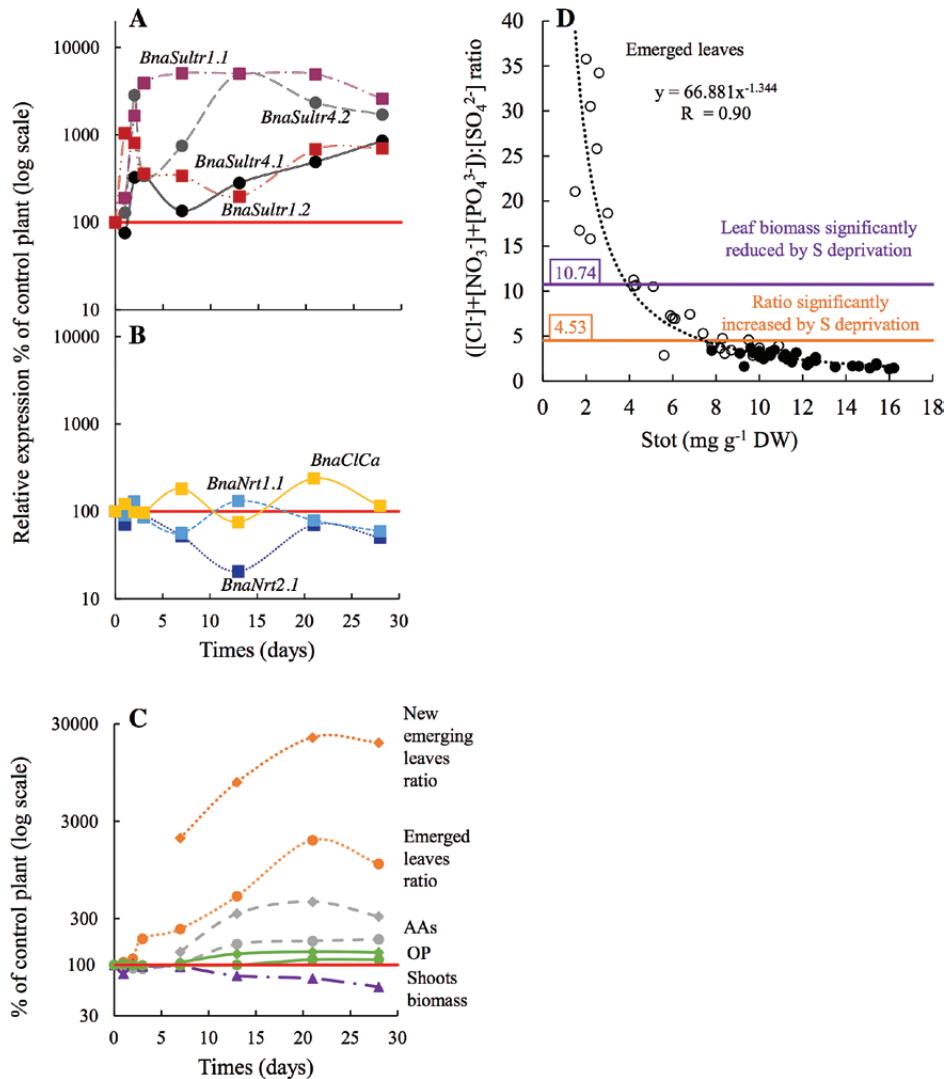


Fig. 8. Effect of S deprivation on relative expression of the (A) *BnaSultr1.1*, *BnaSultr2.1*, *BnaSultr4.1*, *BnaSultr4.2* and (B) *BnaNrt1.1*, *BnaNrt2.1*, *BnaClCa* genes expressed in % of control plants. (C) Effect of S deprivation on different measured parameters expressed in % of control plants: shoots biomass, leaf osmotic potential (OP), leaf total amino acid contents (AAs) and $([Cl^-] + [NO_3^-] + [PO_4^{3-}]) : [SO_4^{2-}]$ ratio in new emerging leaves (closed lozenges), emerged leaves (closed circles), shoots (closed triangles) or roots (closed squares) in *Brassica napus* during 28 days of S deprivation. (D) Relationship between $([Cl^-] + [NO_3^-] + [PO_4^{3-}]) : [SO_4^{2-}]$ ratio and Stot content ($mg\ g^{-1}\ DW$) in emerged leaves from control (closed circles) and S-deprived (open circles) plants during the 28 days of the treatment. The $([Cl^-] + [NO_3^-] + [PO_4^{3-}]) : [SO_4^{2-}]$ ratio was significantly different between control and S-deprived plants for values above 4.53, which it reached 10.74 when emerged leaf biomass were significantly reduced by S deprivation. (This figure is available in colour at JXB online.)

was increased by Cl deprivation and more significantly in emerged leaves. During Cl deprivation, the OAs content (Fig. 5B) was equal to or higher than in the control leaves. In contrast, leaf Ca^{2+} content (Fig. 4D) was significantly lowered by Cl deprivation in a similar manner to S deprivation. Overall, because the leaf osmotic potential remained similar to control plants, the decreased osmotic contribution of Cl^- during deprivation was fully compensated by a general trend of increased NO_3^- , PO_4^{3-} , and OA contents (Fig. 6).

Discussion

Oilseed rape, as in most Brassicaceae, has greater S requirements than other crop species such as cereals. Early identification of S deficiency is of prime importance because of its consequences

for seed yield and quality and for management of S fertilization. This study investigated the impact of S deprivation applied to winter oilseed rape at the rosette stage on leaf osmotic potential and its main components in order to determine whether other mineral and/or organic compounds that may act as osmotica were able to compensate for the absence of SO_4^{2-} under S deprivation. In addition, the impact of S deprivation on osmotic potential was compared to Cl deprivation in order to differentiate osmotic causes and metabolic perturbations.

At the vegetative stage, oilseed rape revealed two response periods to S deprivation. The first one occurred during the first 13 days following the sudden withdrawal of SO_4^{2-} (from $508.7\ \mu M$ to $5.8\ \mu M$) with no significant effect on growth, which was maintained mostly due to the mobilization of vacuolar SO_4^{2-} . After 13 days, S deprivation significantly reduced growth as well as NO_3^- uptake and NR activity (Fig. 7) while

AAs and NO_3^- were accumulated (Figs 5A, 3D). It has been previously shown that S deprivation restricts *de novo* synthesis of amino acids and proteins and that amino acid accumulation resulted mostly from the hydrolysis of previously synthesized proteins (Lee *et al.*, 2013). This accumulation of non-S amino acids may act as a negative feedback on NO_3^- uptake as previously reported (Miller *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Nacry *et al.*, 2013). Our results show that S deprivation significantly reduced NO_3^- uptake after 13 days (Fig. 7A) while a significant accumulation of amino acids was detected after 7 and 13 days in new emerging leaves and emerged leaves, respectively (Figs 5A, 8C). Abdallah *et al.* (2011) have shown that the decrease in S uptake under long-term S deficiency was concomitant with a significant reduction in whole plant N uptake and a repression of the expression of root NO_3^- transporters, in agreement with our result showing a down-regulation *BnaNrt2.1* under S deprivation (Fig. 8B). In this study, it has been also found a continuous decline in NR activity with the duration of S deprivation (Fig. 7B). Such reductions in NR activity in S-deprived rapeseed (*Brassica rapa*), spinach and tobacco have been reported previously (Migge *et al.*, 2000; Prosser *et al.*, 2001; Kaur *et al.*, 2011). Kaur *et al.* (2011) also showed in *B. rapa* plants that S deprivation over six days induced a decrease in the expression level and activity of glutamine synthetase, indicating that S deprivation has a negative effect on N metabolism. Amino acids are also well known to be involved in the down regulation of NR activity (Miller *et al.*, 2007; Campbell, 1999). It may then be suggested that this reduction of NR activity could have explained the NO_3^- accumulation that occurred during S deprivation (Fig. 3D). Earlier reports have also shown large accumulations of NO_3^- , particularly in *Brassica* species under S limitation (McGrath and Zhao, 1996; Koralewska *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2011; Sarda *et al.*, 2014).

In several studies it has been shown that NO_3^- can have an osmotic role. The study conducted by Veen and Kleinendorst (1986) in shoots of Italian ryegrass in which quantum-flux density, osmotic potential of the nutrient solution and availability of NO_3^- and Cl^- were independently tested, indicating that NO_3^- played an important role in osmotic adjustment and that its accumulation resulted from a shortage of other osmotic solutes. Moreover, Veen and Kleinendorst (1986) found Cl^- uptake substituted an equivalent amount of NO_3^- in the plant when NO_3^- was partly replaced by Cl^- in the nutrient solution. Similarly, Ourry *et al.* (1989) showed that NO_3^- acted as an osmotic compound to compensate for the lack of carbohydrates during regrowth after cutting ryegrass. Furthermore, under N limitation, NO_3^- was replaced by Cl^- in order to compensate for the reduction in the osmotic contribution of carbohydrates. More recently, it was shown in shoots of lettuce that NO_3^- accumulation occurred at low light intensities in order to compensate for the decreased content of many soluble organic compounds and so helped to maintain osmotic potential (Burns *et al.*, 2011b). Our results suggest that NO_3^- could act as an osmoticum to replace the SO_4^{2-} content that was reduced during S deprivation. It has been found in oilseed rape that there is a robust linear or logarithmic relationship between S and SO_4^{2-} concentrations in

senescing leaves, stems and seeds and that SO_4^{2-} can represent >70% of the whole plant's total S (Sarda *et al.*, 2014), and as such may have a significant osmotic role. Moreover, SO_4^{2-} represents the most important source of S in leaves of oilseed rape and SO_4^{2-} is mainly stored in the vacuole (Blake-Kalff *et al.*, 1998). In *Arabidopsis thaliana*, it has been shown that water stress induced a greater accumulation of proline, α -aminobutyric acid, malate, citrate, alanine, NO_3^- and SO_4^{2-} (Lugan *et al.*, 2010) and that SO_4^{2-} contributed to ~3% of the total osmotically active particles under control conditions (Lugan *et al.*, 2009). In our study, the osmotic contribution of SO_4^{2-} represented 6.3% of the leaf osmotic potential at day 0, while AAs may account for 3.2% (Fig. 6A) and increased during S deprivation with a maximum of 23% after 21 days in new emerging leaves (Fig. 6B). Our results showed that the osmotic potential of emerged leaves remained stable and similar to control plants during the first 13 days of S deprivation (Fig. 2A). These findings are in accordance with the study conducted by Lee *et al.* (2013) indicating that in oilseed rape leaves, osmotic potential decreased significantly after 9 days of S deficiency. In our study, it has been shown that the lack of SO_4^{2-} and hence its reduced osmotic contribution was fully compensated by an increase in NO_3^- , PO_4^{3-} and Cl^- accumulation (Fig. 3).

During Cl deprivation, leaf osmotic potential remained nearly at a steady state level, and similar to control plants (Fig. 2A). It must be pointed out that during Cl deprivation, the Cl^- leaf content decreased to a lesser extent than SO_4^{2-} in S deficient plants. Chloride content remained at least higher than 5 and 1 mg g⁻¹ DW in emerged and new emerging leaves, respectively (Fig. 3B). Indeed, Cl^- as a free anion in the cells is not assimilated or significantly incorporated into organic molecules, while it participates particularly in compensation and osmoregulation in the whole plant (Xu *et al.*, 2000; Broadley *et al.*, 2012). So, the disappearance of Cl^- was compensated for by accumulation of other compounds such as NO_3^- (Fig. 3D), PO_4^{3-} (Fig. 3C) and OAs (Fig. 5B) without change of SO_4^{2-} (Fig. 3A), which allow maintenance of the leaf osmotic potential without other significant physiological effects during Cl deprivation. This could be explained in Cl-deprived plants, as well as in control plants, by the fact that S- SO_4^{2-} accounted on average for >86% of S in emerged leaves (data not shown), which may be close to the maximum physiological accumulation. Moreover, under Cl deprivation, the reduction of leaf content of Cl^- (Fig. 3B), which mostly is a consequence of leaf dry matter accumulation, occurred in a less drastic way than SO_4^{2-} under S deprivation (Fig. 3A), resulting mostly from vacuolar mobilization. It may then explain why OAs (Fig. 4B), derived from metabolic activity, were accumulated rather than SO_4^{2-} under Cl deprivation.

Whether similar osmotic compensation occurs under NO_3^- or PO_4^{3-} deprivation remained largely unknown. However under our growth conditions, PO_4^{3-} osmotic contribution (Fig. 6A) being fairly low in control plants (about 1.4% of the leaf osmotic potential), an osmotic compensation by Cl^- , SO_4^{2-} or NO_3^- would be quite difficult to evaluate under PO_4^{3-} deprivation. On the other hand, even if it has been previously shown that Cl^- was accumulated under NO_3^- limitation (Ourry

et al., 1989) the osmotic involvement of SO_4^{2-} and PO_4^{3-} was not demonstrated.

During the first 13 days of S deprivation, plant growth was not reduced and the leaf osmotic potential was kept at a steady level. Indeed, previous studies have shown that sulphur mobilization, mostly as SO_4^{2-} , occurred from leaves independently of foliar senescence and when S availability was restricted (Dubousset *et al.*, 2009; Abdallah *et al.*, 2010). In parallel, it has been reported that this mobilization of S was related to an up-regulation of *BnaSultr4.1* and/or *BnaSultr4.2* genes, which are involved in efflux of SO_4^{2-} from vacuoles (Buchner *et al.*, 2004; Kataoka *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007; Dubousset *et al.*, 2009; Abdallah *et al.*, 2010). The present results showing a higher expression of both *BnaSultr4.1* and *BnaSultr4.2* as early as 2 days after S deprivation (Fig. 8A) are in agreement with these previous studies.

The kinetic study of S deprivation that was performed provided further information that could be used to identify early indicators suitable as diagnostic tools to evaluate the S requirements of *B. napus*. A successful diagnostic indicator needs to show a specific and early response to S deficiency and should also be relatively easy to evaluate and possess enough accuracy. There is general agreement that plant analysis could provide a means to detect the S requirements of the crops rather than using soil testing due to the fluctuations in soil S mineralization and S availability throughout the growing season (Malhi *et al.*, 2005). Plant analyses using S, SO_4^{2-} or organic S concentrations as well as N:S or malate: SO_4^{2-} ratios have been tested to predict S deficiency in oilseed rape (for review see Blake-Kalff *et al.*, 2001). It has been shown that concentrations of leaf total S, SO_4^{2-} and glutathione depend on the growth stage and growth rates, making the application of these parameters impractical as diagnostic indicators (Blake-Kalff *et al.*, 2000, 2001). Instead of using absolute values as diagnostic indicators for S deficiency, the use of ratios has already been proposed in the form of N:S or malate: SO_4^{2-} ratios in wheat and oilseed rape (Blake-Kalff *et al.*, 2000). The N:S ratio was not considered to be a reliable indicator because it reflects the relative proportion of the elements rather than their actual magnitude and because it requires two analytical determinations with potentially for input errors from both methods. The malate: SO_4^{2-} ratio is based on the inverse correlations of the concentrations of the two species during S deficiency. Despite its promise as a reliable and practical indicator for determining the S status of plants (Blake-Kalff *et al.*, 2001), the accuracy of the malate: SO_4^{2-} ratio may be questionable because it may vary from 0.1 to 100 without differences in seed yield. In this study, two groups of potential indicators of S deficiency were identified. One group concerns the late indicators corresponding to the response period where S deprivation already had an impact on growth and metabolism. This group included AAs content and osmotic potential (Fig. 8C). Nevertheless, these potential indicators may be used for a correction in fertilization in order to restore S uptake and therefore S and N metabolism (Kaur *et al.*, 2011). Another group corresponds to early indicators that could be usable well before growth reduction and

before metabolic disturbances, allowing the anticipation of S deficiency in order to fertilize if required. The up-regulation of genes encoding SO_4^{2-} transporters is one of the first responses to S deprivation (Fig. 8A). Expression of the *BnaSultr1;1* and *BnaSultr1;2* genes, encoding two high-affinity SO_4^{2-} transporters involved in the majority of SO_4^{2-} root uptake (Buchner *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007), was up-regulated from the first day in response to S deprivation by 2- and 10-fold, respectively, while *BnaSultr1;1* continued to increase during S deprivation (by about 50-fold after 7 days). The genes encoding the SO_4^{2-} transporters, *BnaSultr4;1* and *BnaSultr4;2*, involved in the remobilization of SO_4^{2-} stored in the vacuole (Buchner *et al.*, 2004; Kataoka *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007), were also up-regulated in response to S deprivation after 2 days by approximately 3- and 30-fold, respectively (Fig. 8A). Howarth *et al.*, (2009), have shown that the expression of *sdil* was especially induced in leaf and root tissues in response to S deficiency and *sdil* gene expression had potential as a sensitive indicator of sulphur nutritional status in wheat. However, none of these molecular indicators can be easily used under field conditions, as they require laboratory analysis and the use of control plants. The evaluation of anions involved very early in the osmotic compensation of SO_4^{2-} loss in leaves could be used as an alternative ratio: $([\text{Cl}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{PO}_4^{3-}]) : [\text{SO}_4^{2-}]$. Because osmotic compensation was required during the remobilization of vacuolar SO_4^{2-} mediated by tonoplasmic transporters, significant changes of this ratio occurred after 3 days of S deprivation i.e. after the up-regulation of *BnaSultr 4.1* or *4.2* occurring after 2 days of S deprivation that follow the up-regulation of *BnaSultr 1.1* and *1.2* after 1 day. Internal ratios between compounds have been suggested to vary less than absolute values during plant growth and development (Rasmussen *et al.*, 1977; Maynard *et al.*, 1983; Blake-Kalff *et al.*, 2000, 2001). A significant 185% increase in this ratio occurred in emerged leaves before 3 days, and at 7 days it was 233%. At the same time, the ratio in new emerging leaves was also increased, but by a much higher 20-fold factor at 7 days (Fig. 8C). Compared to the N:S or malate: SO_4^{2-} ratios described by Blake-Kalff *et al.* (2000), the $([\text{Cl}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{PO}_4^{3-}]) : [\text{SO}_4^{2-}]$ ratio required a colorimetric determination from a single leaf extract that could be used under field conditions and might detect S deficiency earlier. Moreover, the anion ratio described in our study involved several anions with potential inter-compensation, allowing minimization of interaction with different fertilizer applications on oilseed rape crops, especially with nitrogen fertilization.

Therefore, the $([\text{Cl}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{PO}_4^{3-}]) : [\text{SO}_4^{2-}]$ ratio could provide an indicator for the risk of S deficiency at early stages, with the added advantage that these anions can be easily quantified in the field compared to S analysis which requires previous mineralization or combustion of the samples. Our proposed ratio was highly correlated to leaf Stot (Fig. 8D) in plants grown under controlled condition allowing the determination of a critical ratio above which growth was restricted by S deprivation. Under our growth conditions, leaves that showed a value of $([\text{Cl}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{PO}_4^{3-}]) : [\text{SO}_4^{2-}]$ ratio above 10.74 corresponded to leaves of S-deprived plants with a

biomass significantly decreased by S deprivation. Moreover, this ratio was significantly changed by S deprivation earlier than leaf growth reduction, for a threshold value above 4.53 (Fig. 8D). More precisely, a value of $([Cl^-]+[NO_3^-]+[PO_4^{3-}] : [SO_4^{2-}])$ ratio lower than 4.53 suggested that the S requirements were satisfied, while a value between 4.53 and 10.74 suggested that S nutrition needs to be improved in order to avoid any growth reduction. However, further testing of this method is required under field conditions in order to estimate a critical value threshold using a range of S fertilizations, as well as verification in the field of both the concentration range and the potential accumulation of Cl^- that was observed under S deprivation in hydroponic culture.

Acknowledgements

The authors are most grateful to the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for the element analysis used in this study and also appreciate the technical help of Marie-Paule Bataillé and Josette Bonnefoy. They acknowledge the Plateforme de Chimie du Végétal at INRA Versailles for metabolomics analysis. They also appreciate the technical help of Julie Levallois for molecular analyses. The authors thank Laurence Cantrill for improving the English in the manuscript. This work, conducted through the SERAPIS project, was supported by the Regional Council of Lower Normandy (grant number 12P03057), the Regional Council of Brittany (grant number 12008011), the European Regional Development Fund (grant number 33525) and Timac Agro International.

References

- Abdallah M, Dubousset L, Meuriot F, Etienne P, Avice J-C, Ourry A. 2010. Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2635–2646.
- Abdallah M, Etienne P, Ourry A, Meuriot F. 2011. Do initial S reserves and mineral S availability alter leaf S-N mobilization and leaf senescence in oilseed rape? *Plant Science* **180**, 511–520.
- Blake-Kalff MMA, Harrison KR, Hawkesford MJ, Zhao FJ, McGrath SP. 1998. Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiology* **118**, 1337–1344.
- Blake-Kalff MMA, Hawkesford MJ, Zhao FJ, McGrath SP. 2000. Diagnosing sulfur deficiency in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Soil* **225**, 95–107.
- Blake-Kalff MMA, Zhao F-J, Hawkesford MJ, McGrath SP. 2001. Using plant analysis to predict yield losses caused by sulphur deficiency. *Annals of Applied Biology* **138**, 123–127.
- Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F. 2012. Function of nutrients: micronutrients. In: Marschner P, ed. *Marschner's Mineral Nutrition Higher Plants*, Third Edition. San Diego: Academic Press, 191–248.
- Buchner P, Takahashi H, Hawkesford MJ. 2004. Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1765–1773.
- Bungard RA, Wiegler A, Morton JD, Andrews M, Press MC, Scholes JD. 1999. Ammonium can stimulate nitrate and nitrite reductase in the absence of nitrate in *Clematis vitalba*. *Plant, Cell and Environment* **22**, 859–866.
- Burns IG, Durnford J, Lynn J, McClement S, Hand P, Pink D. 2012. The influence of genetic variation and nitrogen source on nitrate accumulation and iso-osmotic regulation by lettuce. *Plant and Soil* **352**, 321–339.
- Burns IG, Zhang K, Turner MK, Edmondson R. 2011a. Iso-osmotic regulation of nitrate accumulation in lettuce. *Journal of Plant Nutrition* **34**, 283–313.
- Burns IG, Zhang K, Turner MK, Lynn J, McClement S, Hand P, Pink D. 2011b. Genotype and environment effects on nitrate accumulation in a diversity set of lettuce accessions at commercial maturity: the influence of nitrate uptake and assimilation, osmotic interactions and shoot weight and development. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**, 2217–2233.
- Campbell WH. 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 277–303.
- D'Hooghe P, Dubousset L, Gallardo K, Kopriva S, Avice J-C, Trouverie J. 2014. Evidence for proteomic and metabolic adaptations associated with alterations of seed yield and quality in sulfur-limited *Brassica napus* L. *Molecular and Cellular Proteomics* **13**, 1165–1183.
- Dubousset L, Abdallah M, Desfeux AS, *et al.* 2009. Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3239–3253.
- Dubousset L, Etienne P, Avice JC. 2010. Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages? *Journal of Experimental Botany* **61**, 4313–4324.
- Fiehn O. 2006. Metabolite profiling in *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology* **323**, 439–447.
- Fismes J, Vong PC, Guckert A, Frossard E. 2000. Influence of sulfur on apparent N-use efficiency, yield and quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown on a calcareous soil. *European Journal of Agronomy* **12**, 127–141.
- Grant CA, Mahli SS, Karamanos RE. 2012. Sulfur management for rapeseed. *Field Crops Research* **128**, 119–128.
- Howarth JR, Parmar S, Barraclough PB, Hawkesford MJ. 2009. A sulphur deficiency-induced gene, *sdi1*, involved in the utilization of stored sulphate pools under sulphur-limiting conditions has potential as a diagnostic indicator of sulphur nutritional status. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 200–209.
- Jackson GD. 2000. Effects of nitrogen and sulfur on canola yield and nutrient uptake. *Agronomy Journal* **92**, 644–649.
- Janzen HH, Bettany JR. 1984. Sulfur nutrition of rapeseed: I. Influence of fertilizer nitrogen and sulfur rates. *Soil Science Society of America Journal* **48**, 100–107.
- Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H. 2004. Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 2693–2704.
- Kaur G, Chandna R, Pandey R, Abrol YP, Iqbal M, Ahmad A. 2011. Sulfur starvation and restoration affect nitrate uptake and assimilation in rapeseed. *Protoplasma* **248**, 299–311.
- Koralewska A, Buchner P, Stuiver CEE, Posthumus FS, Kopriva S, Hawkesford MJ, De Kok LJ. 2009. Expression and activity of sulfate transporters and APS reductase in curly kale in response to sulfate deprivation and re-supply. *Journal of Plant Physiology* **166**, 168–179.
- Lee B-R, Jin YL, Avice J-C, Cliquet J-B, Ourry A, Kim T-H. 2009. Increased proline loading to phloem and its effects on nitrogen uptake and assimilation in water-stressed white clover (*Trifolium repens*). *New Phytologist* **182**, 654–663.
- Lee B-R, Muneer S, Kim K-Y, Avice J-C, Ourry A, Kim T-H. 2013. S-deficiency responsive accumulation of amino acids is mainly due to hydrolysis of the previously synthesized proteins—not to de novo synthesis in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum* **147**, 369–380.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* **25**, 402–408.
- Lugan R, Niogret M-F, Kervazo L, Larher FR, Kopka J, Bouchereau A. 2009. Metabolome and water status phenotyping of *Arabidopsis* under abiotic stress cues reveals new insight into *ESK1* function. *Plant, Cell and Environment* **32**, 95–108.
- Lugan R, Niogret M-F, Lepout L, Guégan J-P, Larher FR, Savouré A, Kopka J, Bouchereau A. 2010. Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte: metabolomics of *Thellungiella* under osmotic stress. *The Plant Journal* **64**, 215–229.
- Malhi SS, Gan Y, Raney JP. 2007. Yield, seed quality, and sulfur uptake of oilseed crops in response to sulfur fertilization. *Agronomy Journal* **99**, 570.

- Malhi SS, Schoenau JJ, Grant CA.** 2005. A review of sulphur fertilizer management for optimum yield and quality of canola in the Canadian Great Plains. *Canadian Journal of Plant Science* **85**, 297–307.
- Maynard D, Stewart J, Bettany J.** 1983. Use of plant analysis to predict sulfur deficiency in rapeseed (*Brassica napus* and *Brassica campestris*). *Canadian Journal of Soil Science* **63**, 387–396.
- McGrath SP, Zhao FJ.** 1996. Sulphur uptake, yield responses and the interactions between nitrogen and sulphur in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *The Journal of Agricultural Science* **126**, 53–62.
- McNeill A, Eriksen J, Bergström L, Smith K, Marstorp H, Kirchmann H, Nilsson I.** 2005. Nitrogen and sulphur management: challenges for organic sources in temperate agricultural systems. *Soil Use and Management* **21**, 82–93.
- Migge A, Bork C, Hell R, Becker TW.** 2000. Negative regulation of nitrate reductase gene expression by glutamine or asparagine accumulating in leaves of sulfur-deprived tobacco. *Planta* **211**, 587–595.
- Miller AJ, Fan X, Shen Q, Smith SJ.** 2007. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany* **59**, 111–119.
- Nacry P, Bouguyon E, Gojon A.** 2013. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil* **370**, 1–29.
- Ourry A, Gonzalez B, Boucaud J.** 1989. Osmoregulation and role of nitrate during regrowth after cutting of ryegrass (*Lolium perenne*). *Physiologia Plantarum* **76**, 177–182.
- Parmar S, Buchner P, Hawkesford MJ.** 2007. Leaf developmental stage affects sulfate depletion and specific sulfate transporter expression during sulfur deprivation in *Brassica napus* L. *Plant Biology* **9**, 647–653.
- Prosser IM, Purves JV, Saker LR, Clarkson DT.** 2001. Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *Journal of Experimental Botany* **52**, 113–121.
- Rasmussen PE, Ramig RE, Rohde CR.** 1977. Tissue analyses guidelines for diagnosing sulfur deficiency in white wheat. *Plant and Soil* **46**, 153–163.
- Sarda X, Diquelou S, Abdallah M, Nesi N, Cantat O, Le Gouee P, Avice JC, Ourry A.** 2014. Assessment of sulphur deficiency in commercial oilseed rape crops from plant analysis. *Journal of Agricultural Science* **152**, 616–633.
- Scherer HW.** 2001. Sulphur in crop production. *European Journal Agronomy* **14**, 81–111.
- Veen BW, Kleinendorst A.** 1986. The role of nitrate in osmoregulation of Italian ryegrass. *Plant and Soil* **91**, 433–436.
- Xu GH, Magen H, Tarchitzky J, Kafkafi U.** 2000. Advances in chloride nutrition of plants. In Sparks DL, ed. *Advances in Agronomy*, Vol **68**. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 97–150.
- Zhao FJ, Salmon SE, Withers PJA, Monaghan JM, Evans EJ, Shewry PR, McGrath SP.** 1999. Variation in the breadmaking quality and rheological properties of wheat in relation to sulphur nutrition under field conditions. *Journal of Cereal Science* **30**, 19–31.

Chapitre IV

**Evaluation des effets d'une
limitation en soufre chez le colza
cultivé en conditions de plein champ,
par des mesures simples des teneurs
foliaires en soufre, chlore et
phosphore**



Chapitre IV

Evaluation des effets d'une limitation en soufre chez le colza cultivé en conditions de plein champ, par des mesures simples des teneurs foliaires en soufre, chlore et phosphore

Préambule

Les résultats précédents ayant permis d'identifier le ratio $([Cl^-]+[NO_3^-]+[PO_4^{3-}]):[SO_4^{2-}]$ comme un indicateur potentiel de la nutrition soufrée en conditions contrôlées, nous avons voulu vérifier sa pertinence en conditions de plein champ sur une parcelle oligotrophe en S soumise à différents niveaux de fertilisations N et S. Sa généralité a par ailleurs été testée en conditions hydroponiques chez d'autres espèces végétales. De façon additionnelle, des valeurs seuils pour une version simplifiée de cet indicateur ont été testées sur deux réseaux de parcelles agricoles.

Résultats majeurs :

Les teneurs foliaires en $[Cl^-]$, $[NO_3^-]$ et $[PO_4^{3-}]$ étant positivement affectées par une fertilisation S, le ratio $([Cl^-]+[NO_3^-]+[PO_4^{3-}]):[SO_4^{2-}]$ mesuré dans les feuilles permet de discriminer les plantes selon leur fertilisation S et l'interaction avec l'apport de N. Le ratio $([Cl^-]+[NO_3^-]+[PO_4^{3-}]):[SO_4^{2-}]$ se révèle être un indicateur pertinent et précoce pour diagnostiquer le statut soufré du colza mais aussi d'autres espèces cultivées. Compte tenu des corrélations étroites existant entre la teneur de ces anions et celle de leur élément caractéristique, une version simplifiée correspondant au ratio $([Cl]+[P]):[S]$ est proposée. Des valeurs seuils de ce ratio sont testées afin de classer les parcelles de colza comme ayant un statut suffisant en S, à risque ou en déficient en S.

Ces travaux sont présentés dans le chapitre suivant, sous forme d'un article intitulé « Assessment of sulfur deficiency under field conditions by single measurements of sulfur, chlorine and phosphorus in mature leaves » qui sera soumis à Plant and soil, dès lors que les contraintes de confidentialité seront levées (dépôt de brevet en cours).

Assessment of sulfur deficiency under field conditions by single measurements of sulfur, chlorine and phosphorus in mature leaves

Running title: $([Cl]+[P]):[S]$ ratio detects S deficiency.

Elise Sorin^{1,2,3,4}, Philippe Etienne^{1,2,3}, Anne Maillard^{1,2,3}, Karine Gallardo⁵, Mustapha Arkoun⁴, Florence Cruz⁴, Jean-Claude Yvin⁴, Alain Ourry^{1,2,3}.

¹Normandie Université, Caen, France

²UNICAEN, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, UNICAEN, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

³INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, UNICAEN, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

⁴Centre Mondial d'Innovation, CMI, Groupe Roullier, 27 Avenue Franklin Roosevelt, 35400 Saint-Malo, France

⁵INRA, UMR1347 Agroécologie, Pôle GEAPSI, F-21000 Dijon, France

Corresponding author: Alain Ourry, Normandie Université – INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, UNICAEN, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France. Phone: +33 231 565 653; Fax: +33 231 565 360; E-mail: alain.ourry@unicaen.fr.

In preparation for submission to Plant and soil.

Abstract

Background and Aims. Determination of S status is of prime importance to detect S deficiency and prevent losses of yield and seed quality. This study investigated the possibility of using the $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio as an indicator of S nutrition under field conditions in *Brassica napus* and whether this could be applied to other species.

Methods. Different S and N fertilization applications on an S deficient field of oilseed rape were used to analyze mature leaves for their anion and element contents and evaluate a new S nutrition indicator and useful threshold values. Large sets of commercial crops were then used to monitor S deficiency scenarios.

Results. Under field conditions the leaf $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio was increased by lowering S fertilization, indicating S deficiency. The usefulness of this ratio was also found for other species grown under controlled conditions and it could be simplified by using the elemental $([\text{Cl}]+[\text{P}]):[\text{S}]$ ratio. Threshold values have been determined and used for the hierarchical clustering of commercial crops within three groups: S deficient, at risk of S deficiency and S sufficient.

Conclusions. The $([\text{Cl}]+[\text{P}]):[\text{S}]$ ratio, which can be easily and accurately quantified under field conditions, can be employed as an early diagnostic tool to improve the management of S fertilization.

Key words

Brassica napus, diagnostic tools, indicator of S nutrition, S fertilization, *Triticum aestivum*, *Zea mays*.

Abbreviations

DW: dry weight, HPLC: high performance liquid chromatography, HR ICP-MS: high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry, XRF: X-ray fluorescence.

I. Introduction

Sulfur deficiency in crops has been a major concern at the global scale for a number of years, and especially in crops that require higher levels of S than other cultivated species, such as oilseed rape. Sulfur limitation in oilseed rape crops provokes multiple changes in plant physiology leading to losses of yield and seed quality through modified lipid and protein compositions (Janzen and Bettany 1984; McGrath and Zhao 1996; Scherer 2001; Malhi *et al.* 2007; D’Hooghe *et al.* 2014). Sulfur deficiency in crops has increasingly been observed over the last 40 years (Zhao *et al.* 1999; Blake-Kalff *et al.* 2001; Scherer 2001; McNeill *et al.* 2005). The limited S availability in soil can be explained by several factors: significant reductions in S emission from industrial sources, use of mineral fertilizers without S, decreases in use of organic fertilizers, and changes in cropping systems including the use of high yielding varieties coupled with intensive management practices (Scherer 2001; Grant *et al.* 2012). Seed yield from oilseed rape is usually improved by S fertilization with doses depending on the multiple environment factors under which the crop is being grown (Grant *et al.* 2012). Consequently, a precise recommendation for S fertilization is difficult, resulting in a wide variation in S doses applied under production conditions (from 0 to 112 kg S ha⁻¹, Sarda *et al.* 2014). Consequently, S indicators are needed for an appropriate use of fertilizers to avoid cases of excessive fertilization having environmental and economic consequences, and particularly to avoid cases of S deficiency so as to prevent losses of yield and seed quality (Zhao *et al.* 1999; Blake-Kalff *et al.* 2001).

The visual symptoms of severe S deficiency are characterized by general yellowing and purpling of leaves, which can be quantified by reflectance measurements, although with a lack of specificity (Ayala-Silva and Beyl 2005). Indeed, visual symptoms of S deficiency can be confused with other deficiencies like N deficiency (Zhao *et al.* 1999). They also vary depending on the crop and degree of deficiency, and can be imperceptible while decreasing seed quality (Zuber *et al.* 2013). In order to diagnose S status in crops, methods derived from soil testing, modeling or plant analysis have already been proposed. Different soil tests have been developed to evaluate the amounts of inorganic SO₄²⁻ in soil and the potential mineralization capacity of soil organic S compounds (Scherer, 2009). However, chemical analyses of soil have not proved successful to evaluate the amount of S available for the crops and hence the requirement of fertilization because of a high variability of S availability in soils due to fluctuations of mineralization, immobilization or leaching throughout the growing season (Malhi *et al.* 2005; Szulc *et al.* 2014). McGrath and Zhao (1995) have proposed a computer model to predict the risk of S deficiency in cereals in Great Britain using soil, atmospheric S deposition and meteorological data. This modeling approach identifies where S deficiency is likely to occur for a large scale assessment, but it is not designed to be used

at the field scale (Zhao *et al.* 1999). In oilseed rape, a model based on the process of S allocation and partitioning might be relevant for determining the response to S nutrition under controlled conditions (Brunel-Muguet *et al.* 2015b) but it needs to be validated under field conditions.

Plant analyses appear as a better means to identify S deficiency and evaluate soil fertility and crop management strategies (Melsted *et al.* 1969). Different indicators of S nutrition using plant analysis have been proposed, *i.e.* the N:S ratio (Rasmussen *et al.* 1977), the SO_4^{2-} :total S ratio (Spencer and Freney 1980), SO_4^{2-} (Scaife and Burns 1986), total S (Pinkerton 1998), the malate: SO_4^{2-} ratio (Blake-Kalff *et al.* 2000a), glutathione (Zhao *et al.* 1996), amides (Zhao *et al.* 1996) or expression of sulfur deficiency responsive genes (Howarth *et al.* 2009; Sorin *et al.* 2015), each presenting advantages and drawbacks. Gene expression has potential as a sensitive indicator of S nutritional status because of its very early response. Indeed, Howarth *et al.* (2009) have shown that the expression of the *sdi1* gene was induced especially in leaf and root tissues in response to S deficiency in wheat. In oilseed rape, the up-regulation of genes encoding SO_4^{2-} transporters (*BnaSultr1;1*, *BnaSultr1;2*, *BnaSultr4;1* and *BnaSultr4;2*) is one of the first responses to S deprivation (Sorin *et al.* 2015). However, none of these molecular indicators can be easily used under field conditions as they require laboratory analysis and the use of control plants. The use of biochemical indicators in response to S deficiency has been suggested, such as a rapid decrease in glutathione (Zhao *et al.* 1996; Blake-Kalff *et al.* 1998; Blake-Kalff *et al.* 2000a; Honsel *et al.* 2012) and a large accumulation of asparagine and glutamine (Zhao *et al.* 1996). However, the concentrations of these molecules can be influenced by factors other than S nutrition, such as salinity, water or temperature stress (Rabe 1999; Tausz 2001) and their diagnostic usefulness has been questioned. The SO_4^{2-} and total S concentrations have been proposed by Scaife and Burns (1986) and Pinkerton (1998) as the most satisfactory indices of plant S status because of the very wide range of values with clear changes from deficiency to sufficiency. These parameters present the added advantage of requiring only one measurement.

It has been shown that ratios of mineral (or organic) plant compounds can predict S nutrition more reliably than absolute values of one or more contents of mineral (or organic) compounds. Indeed, it has been suggested that ratios between compounds varied less with plant growth stages and growth rates than absolute values (Rasmussen *et al.* 1977; Maynard *et al.* 1983; Blake-Kalff *et al.* 2000a; Blake-Kalff *et al.* 2001). The SO_4^{2-} :total S ratio has been proposed by Spencer and Freney (1980) as a useful guide to S fertilization because it is not strongly affected by the age of the plant or N supply. However, Scaife and Burns (1986) criticized this use of the SO_4^{2-} :total S ratio instead of SO_4^{2-} or total S alone because the change in total S is partly due to the levels of SO_4^{2-} , thus the numerator (SO_4^{2-}) depends on the denominator (total S), which reduces the

sensitivity of the indicator. Rasmussen *et al.* (1977) proposed the N:S ratio for wheat at the vegetative stage. Compared to the total S concentration of vegetative tissues, the N:S ratio also decreases, but to a lesser extent, so that its use as an indicator requires sampling at a precise growth stage (McGrath and Zhao 1996). Moreover, this ratio should be interpreted with caution because it can be affected by oversupply of N without S deficiency. Recently, the N:S ratio in grain has been used as the most accurate diagnostic tool by many agronomists and the farming industry for S deficiency in crops. However, the grain N:S ratio is not a predictive test as it indicates that the harvested crop may have been S deficient, so that S fertilization can be increased for the following crop (Blake-Kalff *et al.* 2004; Carver 2005). Alternately, Blake-Kalff *et al.* (2000a and 2004) proposed the malate: SO_4^{2-} ratio as a diagnostic indicator of S deficiency in wheat and oilseed rape. This ratio is based on the inverse relationship between malate and SO_4^{2-} concentrations in leaves, when the SO_4^{2-} concentrations decrease, the malate concentrations increase and *vice versa*. This ratio has the advantage of being stable throughout plant development when the S supply is sufficient. Moreover, it can be calculated from a single analytical run by using the peak areas of malate and SO_4^{2-} , avoiding the problems of accurate calibration. Studies on the reliability of the malate: SO_4^{2-} ratio indicate that it overestimated diagnosis of S deficiency and suggested that threshold values need to be reconsidered (Carver 2005; Reussi *et al.* 2011). More recently, Sorin *et al.* 2015 suggested that the $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio could provide a relevant early indicator of S deficiency in oilseed rape. This new early indicator of S nutrition identified under controlled conditions in oilseed rape is based on early physiological regulation that occurs before significant metabolic perturbations. It was shown that vacuolar SO_4^{2-} , acting as an osmoticum, was efficiently remobilized during S deprivation to sustain plant growth. This was compensated osmotically by a vacuolar accumulation of Cl^- , NO_3^- and PO_4^{3-} . This mechanism of osmotic compensation occurred as early as 3 days after S deprivation and long before metabolic disturbances and growth reduction in oilseed rape.

The main objectives of the current work were to validate the use of the $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio as an indicator of S nutrition under field conditions. The first objective was to test the $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio in leaves of oilseed rape grown under field conditions with different S and N fertilization rates on an S deficient field, and consequently if it constitutes a relevant indicator to predict the risk of S deficiency under field conditions. The second objective was to test the genericity of the $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio as an indicator of S deficiency in other species of different families such as *Brassica oleracea*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Medicago truncatula* and *Solanum lycopersicum* under controlled conditions. Finally, the last aim was to simplify the quantification of the $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio, by using

elemental analysis of Cl, P and S in order to facilitate the measurement under field conditions and to cope with the timing required to quickly adjust S fertilization before oilseed rape flowering.

II. Materials and Methods

II.1. Field experiments and plant sampling

II.1.1. Field experiment 1: study of different fertilization rates on an S deficient field

The experimental site was selected from a previous study (Sarda *et al.* 2014) showing an S deficiency in *B. napus* L. grown in 2009. This field of 11.3 ha was located at Ondefontaine, France (48°59'18.69" N, 00°41'56.70" W). A winter oilseed rape crop (*B. napus* L., 95% cv DK Exstorm and 5% cv Alicia) was sown with a density of 35-40 plants m⁻² on 27 august 2013. The previous crop was spring barley (*Hordeum vulgare* L.). Chemical analyses of the loam soil provided an S content of 220 mg kg⁻¹ and a pH value of 6.4. Before crop establishment, organic fertilizer (40 m³ ha⁻¹ of bovine manure) was applied to the whole field corresponding to 122 kg N ha⁻¹ and 44 kg S ha⁻¹. The field was separated into seven randomized plots fertilized with different doses of N and S mineral fertilizer. One plot was unfertilized. Other plots were fertilized on 27 February 2014 with three different doses of S fertilizer at 0, 12 and 36 kg S ha⁻¹ with a combined fertilizer: ammonium and nitrate and sulfuric anhydride, 26% N and 36% SO₃ and complemented with ammonium nitrate to obtain 65 kg N ha⁻¹ on each plot. Then, on 27 March 2014, a second N fertilization with 60 kg N ha⁻¹ (liquid N containing 50% urea, 25% ammonium and 25% nitrate) was applied to three plots, which thus received 125 kg N ha⁻¹ after two fertilizer applications.

Five harvests were performed between January and July 2014: before fertilization (at the rosette stage and at the start of stem elongation (GS30), January 30th 2014 and February 12th 2014), 15 days after S fertilization (start of the visible bud stage (GS50), March 14th 2014), 47 days after S fertilization (silique formation stage (GS70), April 15th 2014) and finally after 60 days (silique formation stage (GS70), April 28th 2014). Two batches of leaves comprising mature leaves (from the lower canopy) and young leaves (from the higher canopy), each of them consisting of three replicates of 20 leaves, were randomly collected from each plot. Leaves were freeze-dried for dry weight (DW) determination and ground, using an oscillating grinder (MM400, Retsch, Haan, Germany) to fine powder for further analysis.

II.1.2. Field experiment 2: study of 45 commercial crops before fertilization and flowering

Forty-five commercial crops of oilseed rape were selected in France according to different locations (**Supplemental data SD1**), different agricultural practices (dose of fertilizers, previous crop, tillage), and under contrasting soil and climate conditions that may affect SO_4^{2-} leaching and hence SO_4^{2-} availability. The farmers, identified with the help of DATAGRI (Lyon, France), collaborated in the present study. Crops have been numbered arbitrarily, 1' to 45'. Two batches of leaves comprising mature leaves (from the lower canopy) and young leaves (from the higher canopy), each of them consisting of 20 leaves, were randomly collected from each of the 45 fields in February 2014, just at the end of winter corresponding to the start of stem elongation (GS30) and before fertilization. Leaves were freeze-dried before laboratory processing.

In addition, four commercial crops were studied before and after fertilization. Agricultural practices were managed by the farmers and the authors did not intervene in the choice of fertilizer doses. These four crops were located in France at Indre (N 46°36'48", E 02°06'41") corresponding to crop number 8', Loiret (N 48°06'59", E 02°25'04") corresponding to crop number 11', Indre-et-Loire (N 47°06'05", E 00°22'14") corresponding to crop number 20' and Seine-et-Marne (N 48°30'28", E 02°49'56") corresponding to crop number 36'. Two harvests occurred between January and May 2014: before fertilization (at the rosette stage and at the start of stem elongation (GS30), February 2014) and after N and S fertilizers were applied by the farmers (stage of silique formation (GS70), April 2014). Leaves were collected as for the 45 crops, with three replicates of leaves collected.

II.1.3. Field experiment 3: study of 56 commercial crops after fertilization and flowering

In order to maximize variability for S status at the late stage of oilseed rape development, 56 commercial crops were selected in Calvados (Lower Normandy, France) during a previous study (Sarda *et al.* 2014). The numbering of crops was performed in accordance with Sarda *et al.* (2014). Fifty senescent leaves (*i.e.* yellowing, just before their abscission) were randomly collected after flowering (May 2009) from each of the 56 fields. Four biological replicates of plants were used per condition and harvesting date. Leaf samples were kept at 4°C for a short period before drying at 60°C for 72h.

II.2. Multispecies experiment under controlled conditions

In order to assess whether data obtained with *B. napus* could be extrapolated to other species, experiments using *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *S. lycopersicum*, *M. truncatula* and *B. napus* grown under controlled conditions were conducted under different culture conditions described in **Supplemental data SD2** with optimal and sub-optimal S alimentation. Leaves were harvested and frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C until freeze-drying for further analysis.

II.3. SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Cl^- and NO_3^- analysis

Ions were extracted from 30 mg of freeze-dried plant material and were initially mixed with 1.5 ml of 50% ethanol solution. After incubation at 40°C for 1 h, the extract was centrifuged at 12000 g for 20 min and the supernatant was collected. This step was repeated on the pellet and the resulting supernatant obtained was pooled with the previous one. All these operations (*i.e.* incubation and centrifugation) were repeated twice, but with 1.5 ml of ultra-pure water and incubation at 95°C. All the supernatants were pooled and evaporated under vacuum (Concentrator Evaporator RC 10.22, Jouan, Saint-Herblain, France). The dry residue was re-suspended in 1.5 ml of ultra-pure water and was filtered on 45 µm filters.

Thereafter, anion contents were determined using high performance liquid chromatography (HPLC) with a conductivity detector (ICS3000, Thermo Scientific-Dionex, Villebon-sur-Yvette, France). The eluent solution for anion analysis consisted of 4.05 mM Na_2CO_3 and 1.26 mM NaHCO_3 and was pumped isocratically over an analytical column (AS22 4*250 mm, Thermo Scientific-Dionex, Villebon-sur-Yvette, France).

II.4. S, P, Cl and N analysis

After drying and grinding, leaf samples were placed in sample cups and S, P and Cl were determined with X-ray fluorescence (XRF) analysis (Portable XRF S1 TITAN 800, Bruker, Kalkar, Germany). Quantification of each element was performed using calibration curves of samples quantified by High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HR ICP-MS, Thermo Scientific, Element 2™, Bremen, Germany) (Maillard *et al.* 2015). For N analysis, an aliquot of each dried sample was placed into tin capsules using a microbalance and the total N content was

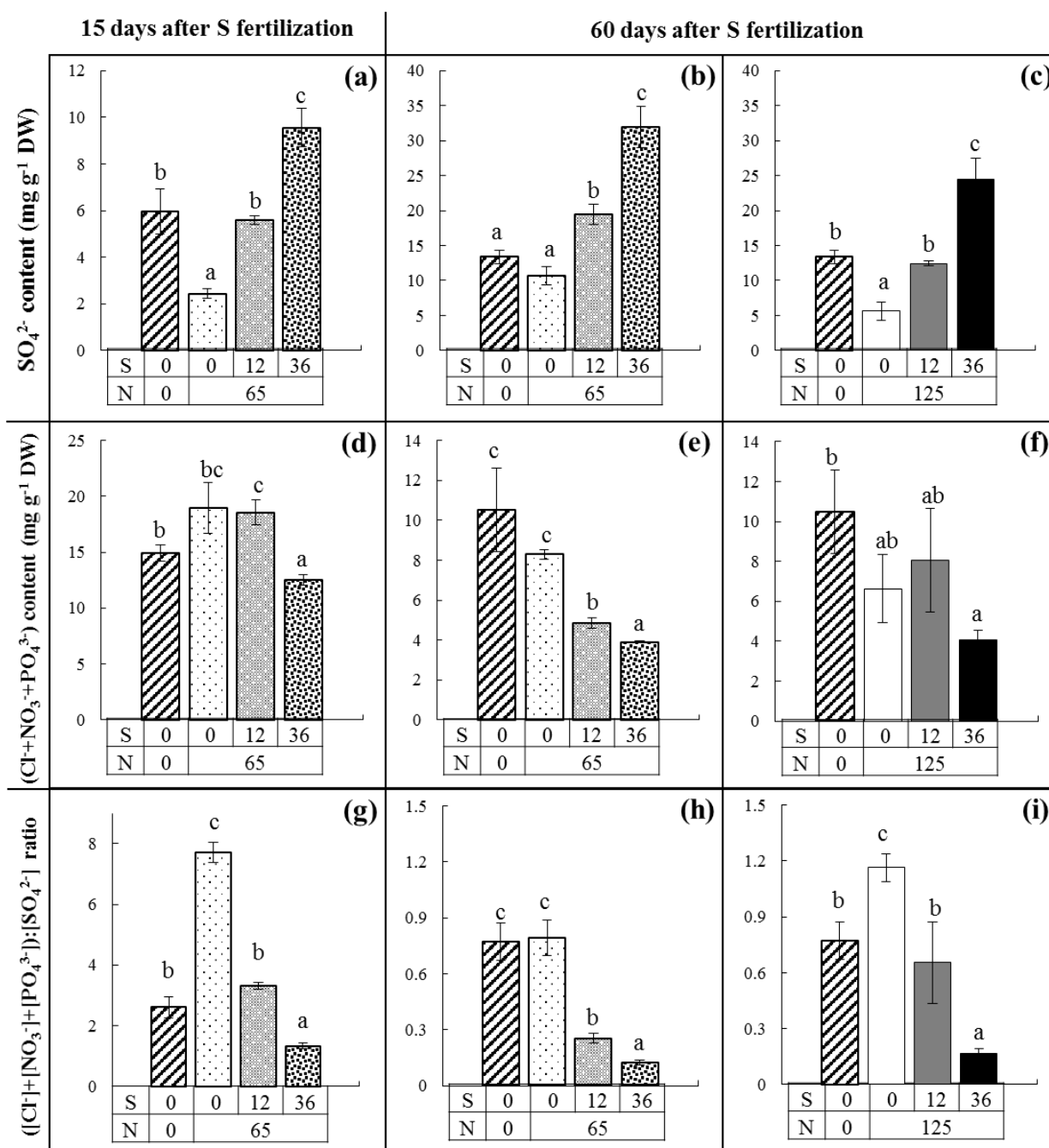


Fig. 1 (a-c) SO_4^{2-} contents (mg g⁻¹ DW), (d-f) (Cl⁻+NO₃⁻+PO₄³⁻) contents (mg g⁻¹ DW) and (g-i) the ([Cl⁻]+[NO₃⁻]+[PO₄³⁻]):[SO₄²⁻] ratio in mature leaves of oilseed rape grown under field conditions (field experiment 1), after (a, d, g) 15 and (b, c, e, f, h, i) 60 days of S fertilization. Plants received no mineral fertilization (hatched bars, 0 kg S ha⁻¹, 0 kg N ha⁻¹) or 0 (white bars), 12 (gray bars) or 36 (black bars) kg S ha⁻¹, with 65 (dashed bars) or 125 (full bars) kg N ha⁻¹. Within the same graph, letters when different indicate significant difference between fertilization treatments for $P < 0.05$.

determined with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Horizon, NU Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy).

II.5. Statistical analysis

For field experiment 1, three replicates corresponding to a pool of 20 leaves of 20 independent plants were collected. Data are reported as mean \pm SE for $n=3$ and were analyzed by Student's test (Excel software) and marked by different letters when they were significantly different between treatments at a given date, at $P<0.05$. For the second part of field experiment 2, three replicates corresponding to a pool of 20 leaves of 20 independent plants were collected. These data are also reported as mean \pm SE for $n=3$ and were analyzed by Student's test (Excel software) and marked by different letters when they were significantly different between crops at a given date, at $P<0.05$, and marked by one or several asterisks when significantly different before and after fertilization ($*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$). All experiments on different species in controlled conditions were conducted with four independent biological replicates. Data are reported as mean \pm SE for $n=4$. All data of the multispecies experiment were analyzed by Student's test (Excel software) and marked by one or several asterisks when significantly different between controls and S-deprived plants ($*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$).

III. Results

III.1. Under field conditions, a decrease in the SO_4^{2-} content was compensated by an increase in the $(\text{Cl}^- + \text{NO}_3^- + \text{PO}_4^{3-})$ contents in oilseed rape leaves leading to an increase in the $([\text{Cl}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{PO}_4^{3-}] : [\text{SO}_4^{2-}])$ ratio

For field experiment 1, SO_4^{2-} , Cl^- , NO_3^- and PO_4^{3-} contents and the $([\text{Cl}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{PO}_4^{3-}] : [\text{SO}_4^{2-}])$ ratio were quantified in leaves of oilseed rape at 15, 47 and 60 days after S fertilization. Similar observations were found at 47 and 60 days after S fertilization, and to simplify reading only the results at 60 days after S fertilization are presented. The SO_4^{2-} content (Fig. 1a-c) was decreased significantly in mature leaves by a reduction in S fertilization (from 36, 12 to 0 kg S ha^{-1}), whatever the dose of N fertilization (65 or 125 kg N ha^{-1}). The decrease in SO_4^{2-} content in mature leaves was compensated by an increase in Cl^- , NO_3^- , and PO_4^{3-} contents (Fig. 1d-f). The lowest $(\text{Cl}^- + \text{NO}_3^- + \text{PO}_4^{3-})$ content was found in mature leaves of plants fertilized with the highest dose of S (*i.e.* 36 kg S ha^{-1}). The $([\text{Cl}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{PO}_4^{3-}] : [\text{SO}_4^{2-}])$ ratio (Fig. 1g-i) differentiated the three

Table 1 SO₄²⁻ contents (mg g⁻¹ DW), (Cl+NO₃+PO₄³⁻) contents (mg g⁻¹ DW) and ([Cl⁻]+[NO₃⁻]+[PO₄³⁻]):[SO₄²⁻] ratios in leaves of *B. napus*, *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *S. lycopersicum* and *M. truncatula* following different S treatments (+S: control treatment, -S: S deficiency treatment) of plants grown under controlled conditions (given in Supplemental Data SD2). Data are given as the mean ± SE (n=4). *, **, and *** indicate significant difference between control and S deprived plants for P<0.05, P<0.01 and P<0.001, respectively.

Species	Days during treatment	SO ₄ ²⁻ content (mg g ⁻¹ DW)		(Cl+NO ₃ +PO ₄ ³⁻) content (mg g ⁻¹ DW)		([Cl ⁻]+[NO ₃ ⁻]+[PO ₄ ³⁻]):[SO ₄ ²⁻] ratio	
		+S	-S	+S	-S	+S	-S
<i>B. napus</i>	0	8.13 ± 0.61		56.79 ± 7.37		2.34 ± 0.28	
	3	8.73 ± 0.41	5.30 ± 0.48 ***	63.65 ± 0.96	70.86 ± 5.68	2.44 ± 0.11	4.53 ± 0.39 **
	13	9.95 ± 0.17	2.68 ± 0.16 ***	62.83 ± 5.86	86.42 ± 4.66 **	2.11 ± 0.20	10.74 ± 0.17 ***
	135	7.05 ± 1.22	0.35 ± 0.04 ***	44.9 ± 6.85	61.87 ± 3.27 *	6.60 ± 1.06	192.24 ± 40.89 **
<i>T. aestivum</i>	0	3.03 ± 0.09		63.58 ± 0.80		21.02 ± 0.76	
	8	1.94 ± 0.05	1.15 ± 0.03 ***	59.34 ± 2.10	68.04 ± 0.84 **	30.54 ± 0.53	59.60 ± 2.36 ***
	16	2.17 ± 0.06	0.50 ± 0.05 ***	64.79 ± 1.29	70.19 ± 1.80 *	30.01 ± 1.28	146.03 ± 15.81 ***
<i>Z. mays</i>	0	2.02 ± 0.49		74.74 ± 1.55		42.15 ± 7.16	
	5	3.44 ± 0.07	1.39 ± 0.08 ***	78.31 ± 2.82	91.71 ± 1.28 **	22.83 ± 1.09	66.49 ± 3.45 ***
	18	1.38 ± 0.05	0.27 ± 0.02 ***	70.38 ± 3.46	103.28 ± 0.79 ***	51.01 ± 2.19	384.67 ± 23.44 ***
<i>S. lycopersicum</i>	75	63.75 ± 4.79	50.39 ± 2.42 *	68.84 ± 4.61	84.77 ± 2.44 *	1.11 ± 0.15	1.69 ± 0.10 **
<i>M. truncatula</i>	0	3.31 ± 0.16		25.32 ± 0.60		7.68 ± 0.21	
	8	3.60 ± 0.12	0.15 ± 0.003 ***	25.40 ± 1.54	34.27 ± 3.44 *	7.07 ± 0.48	231.78 ± 25.21 ***
	21	4.75 ± 0.18	0.26 ± 0.01 ***	25.92 ± 1.94	34.90 ± 2.46 *	5.49 ± 0.50	133.04 ± 12.48 ***

plots according to S fertilization: 0, 12, 36 kg S ha⁻¹. Mature leaves of plants receiving N fertilization (65 or 125 kg N ha⁻¹) without S had the highest $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio, whereas the mature leaves of plants with 36 kg S ha⁻¹ had the lowest, and mature leaves of plants with 12 kg S ha⁻¹ presented an intermediate $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio.

Interactions between N and S fertilization were also found. It can be assumed that the growth rate was mostly reduced by N unavailability. For example, 15 days after S fertilization, the biomass of mature leaves was 5.03 ± 0.38 g DW leaf⁻¹ in the unfertilized plot whereas in the plot with 65 kg N ha⁻¹ the biomass was 6.70 ± 0.01 g DW leaf⁻¹ ($P < 0.01$). This reduced growth of N unfertilized plants had a direct consequence on the SO_4^{2-} content because SO_4^{2-} requirements were lower than in N fertilized plants, which used SO_4^{2-} to ensure growth. For example, for the same S fertilization rate, the SO_4^{2-} content (Fig. 1a-c) in mature leaves of plant without N fertilization was significantly higher than (Fig. 1a and c) or similar to (Fig. 1b) the content in leaves of plants with N fertilization. Moreover, compared to leaves from plants with N fertilization and without S fertilization, the $(\text{Cl}^-+\text{NO}_3^-+\text{PO}_4^{3-})$ content (Fig. 1d-f) in mature leaves of the N unfertilized plot was significantly unchanged after 15 and 60 days. As a consequence, the $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio (Fig. 1g-i) decreased significantly (Fig. 1g and i) or was similar (Fig. 1h) in the absence of N mineral fertilization in mature leaves, reflecting lower S requirements. In the same way, plant growth was stimulated by a second N fertilization of 60 kg N ha⁻¹ (corresponding to plots with 125 kg N ha⁻¹) and consequently the S requirements were increased, reducing the SO_4^{2-} content in mature leaves ($P < 0.05$, when comparing Fig. 1b and c). The second N fertilization had no significant impact on the $(\text{Cl}^-+\text{NO}_3^-+\text{PO}_4^{3-})$ contents of mature leaves (Fig. 1f) but these ions tended to increase for a given dose of S fertilization (0, 12 or 36 kg S ha⁻¹) compared to plants with 65 kg N ha⁻¹ (Fig. 1e). So, when comparing Fig. 1h and i, the $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio was increased in mature leaves of plants receiving high N fertilization (Fig. 1i), which reflected a higher requirement for S.

The same analyses were also performed with younger leaves (data not shown) but the statistical significance of differences between plants receiving N or S fertilizations was lower than with mature leaves. Consequently, for the other experiments only data obtained from mature leaves will be given.

III.2. The $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio can be used in other plant species to detect S deficiency under controlled conditions

The $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio was also calculated in leaves of *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *M. truncatula*, *S. lycopersicum* and *B. napus* grown under controlled conditions

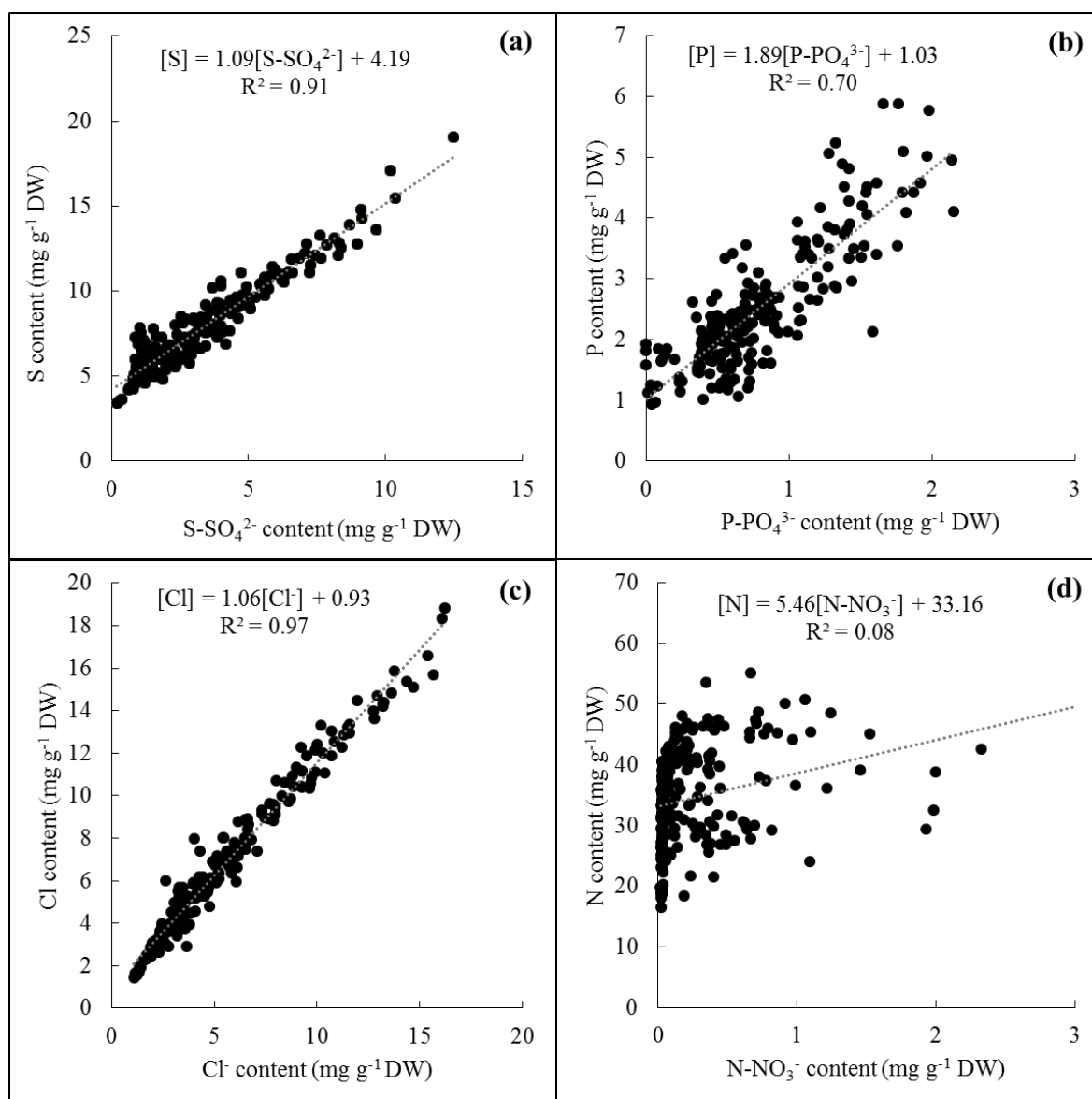


Fig. 2 Correlation between (a) S-SO_4^{2-} and S content (mg g^{-1} DW), (b) P-PO_4^{3-} and P content (mg g^{-1} DW), (c) Cl^- and Cl content (mg g^{-1} DW) and (d) N-NO_3^- and N content (mg g^{-1} DW). Ion contents were quantified by HPLC and element contents by XRF, except N which was quantified by IRMS, in leaves of oilseed rape grown under field conditions (field experiment 1 and the second part of field experiment 2). Data used were obtained from plants of all fertilization treatments.

with or without S restriction (**Table 1**). In all species, S deficiency decreased the SO_4^{2-} content in leaf tissue and significantly increased $(\text{Cl}^- + \text{NO}_3^- + \text{PO}_4^{3-})$ contents. Consequently, the $([\text{Cl}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{PO}_4^{3-}] : [\text{SO}_4^{2-}])$ ratio was highly and significantly increased by S deficiency as soon as 3 days after treatment in *B. napus*, 8 days in *T. aestivum*, 5 days in *Z. mays* and 8 days in *M. truncatula* and this increase was even amplified in the mid to long term. However, if no early harvest was performed with *B. oleracea* and *S. lycopersicum*, a significant increase in the $([\text{Cl}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{PO}_4^{3-}] : [\text{SO}_4^{2-}])$ ratio during S deficiency was found in the longer term (*i.e.* after 135 days of S deficiency in *B. oleracea* and after 75 days in *S. lycopersicum*). Finally, it must be pointed out that the absolute value of this ratio was species specific, and probably a result of the intrinsic capacity of a plant species to store SO_4^{2-} in leaves, as illustrated by the two *Brassica* species as well as tomato which accumulated higher levels of SO_4^{2-} (**Table 1**).

III.3. The simplified $([\text{Cl}^-] + [\text{P}]) : [\text{S}]$ ratio could be used for an easier and faster determination of S deficiency under field conditions

With the idea of being able to perform single field analysis, a simplification of the measurement of the $([\text{Cl}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{PO}_4^{3-}] : [\text{SO}_4^{2-}])$ ratio has been searched, and the first step was to assess whether ion contents, Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} and SO_4^{2-} were significantly correlated to the element contents Cl, N, P and S, respectively. The resulting correlations between ion contents measured by HPLC and element contents measured by handheld X-Ray Fluorescence spectrometry (XRF) are given in **Fig. 2**. In oilseed rape leaves, the ions SO_4^{2-} , PO_4^{3-} and Cl^- were highly linearly correlated to their respective elements S, P and Cl (**Fig. 2a-c**) with correlation coefficients of 0.91, 0.70 and 0.97, respectively. Such strong linear relationships can be easily explained by the fact that these ions represented the main proportion of the corresponding element in mature leaves because up to 56, 70 and 95% of P, S and Cl were in the form of PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , and Cl^- , respectively. On the other hand, no significant correlation was found between NO_3^- and N contents in leaves of oilseed rape (**Fig. 2d**), which was the result of very low NO_3^- contents in leaves of plants grown under field conditions (from 0.1 to 5 mg g^{-1}) data not shown). Consequently, for plants from field experiment 1, the anionic ratio $([\text{Cl}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{PO}_4^{3-}] : [\text{SO}_4^{2-}])$ was significantly correlated to the $([\text{Cl}^-] + [\text{P}]) : [\text{S}]$ ratio (**Fig. 3a**) by a second order polynomial equation with a correlation coefficient of 0.94 showing a saturation plateau for higher values of the $([\text{Cl}^-] + [\text{P}]) : [\text{S}]$ ratio. This previous graph was split in order to separate data from plants harvested before flowering (**Fig. 3b**, plants harvested before fertilization and 15 days after fertilization when plants were at the start of the visible bud stage) and after flowering (**Fig. 3c**, plants harvested 47 and 60 days after S fertilization for which plants were at the stage of

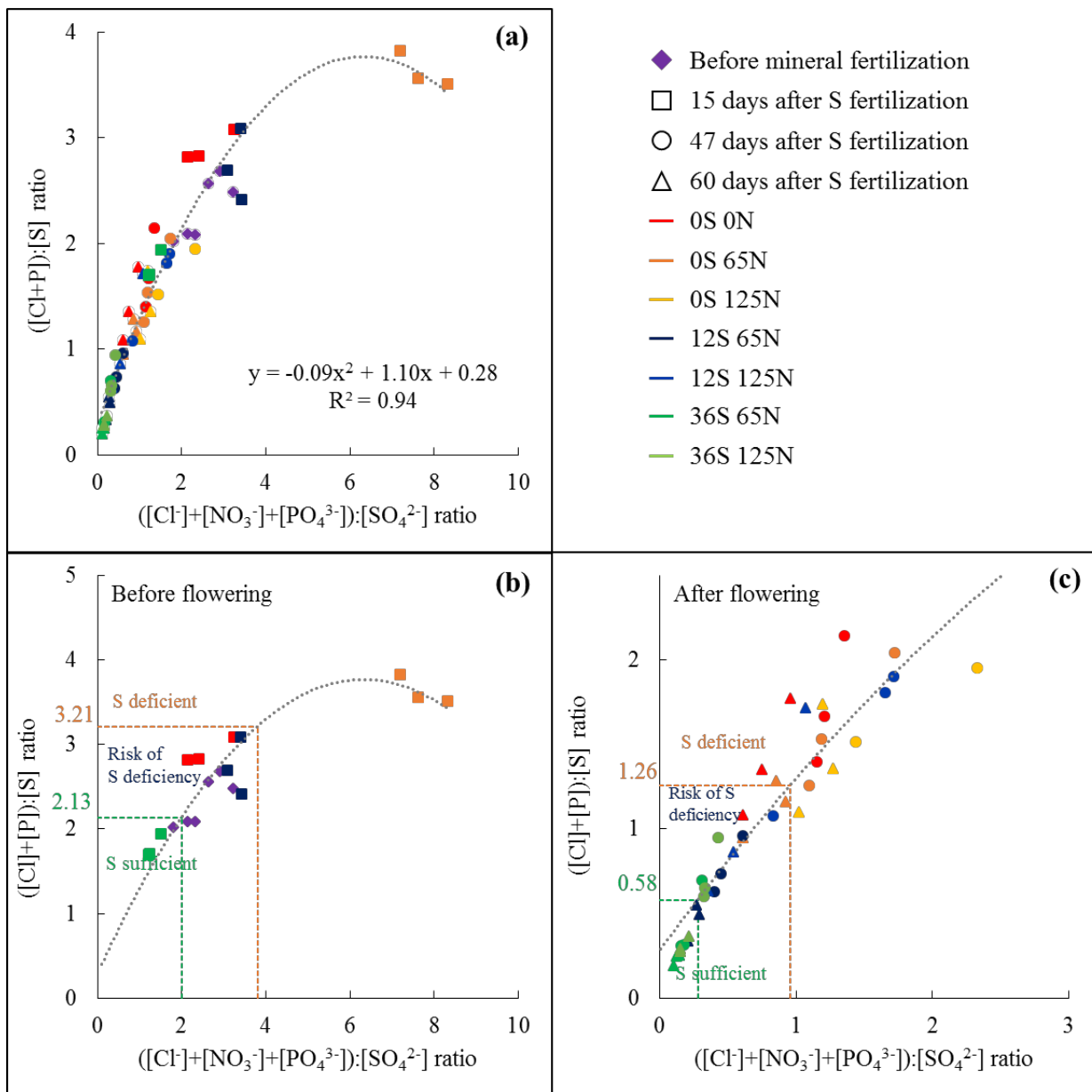


Fig. 3 Correlation between the $([Cl^-]+[NO_3^-]+[PO_4^{3-}]):[SO_4^{2-}]$ ratio and the $([Cl^-]+[P]):[S]$ ratio in mature leaves of oilseed rape submitted to different N and S fertilization rates (field experiment 1), (a) for all data points (all fertilization treatments, mature leaves harvested before mineral fertilization, or 15, 47 or 60 days after S fertilization), or for mature leaf samples harvested (b) before or (c) after flowering. Thresholds of the $([Cl^-]+[P]):[S]$ ratio were determined as the difference or sum between the mean and the 95% confidence interval of plants receiving 0 or 36 kg S ha⁻¹, defining three groups of plants: S deficient, at risk of S deficiency and S sufficient plants.

siliques formation) to assess whether this ratio was affected by plant development and then to determine putative threshold values. Before flowering (**Fig. 3b**), both ratios were higher than after flowering (**Fig. 3c**) with the values being between 1.69 and 3.83 for the $([Cl]+[P]):[S]$ ratio in plots with high S and low S fertilization, respectively. After flowering the $([Cl]+[P]):[S]$ ratio values (**Fig. 3d**) were lower, between 0.19 (high S fertilization) and 2.14 (no S fertilization). Before any mineral fertilization the $([Cl]+[P]):[S]$ ratios of leaves were between 2.02 and 2.68 (**Fig. 3a-b** purple diamonds) and without S fertilization (*i.e.* 0 kg S ha⁻¹, orange squares) the ratio increased and to a lesser extent for the unfertilized plot (*i.e.* 0 kg S ha⁻¹ and 0 kg N ha⁻¹, red squares) whereas it decreased at 36 kg S ha⁻¹ (green squares).

III.4. Determination of threshold values of the $([Cl]+[P]):[S]$ ratio and their use on independent fields

Two sets of threshold values of the $([Cl]+[P]):[S]$ ratio were determined: before flowering with a potential use to determine whether or not S fertilization was required and after flowering to assess whether plants were S deficient. Threshold values were then calculated from data given in **Fig. 3b and c** as the sum or difference between the $([Cl]+[P]):[S]$ ratio mean and the 95% confidence interval of S sufficient plots (36 kg S ha⁻¹) and S deficient plots (0 kg S ha⁻¹), respectively. The threshold values were then 2.13 and 3.21 before flowering whereas they were 0.58 and 1.26 after flowering. Such thresholds would allow clustering of the plots within three groups of crops: S sufficient (ratio <2.13 or 0.58 after flowering), at risk of S deficiency (ratio between 2.13 and 3.21 or between 0.58 and 1.26 after flowering) and S deficient (ratio >3.21 or 1.26 after flowering) (**Fig. 3b-c**).

This classification of oilseed rape crops into three groups, according to their S nutrition status evaluated by the leaf $([Cl]+[P]):[S]$ ratio, has been tested on two sets of independent commercial crops (**Fig. 4**). The first set corresponds to 45 commercial crops from different locations in France and for which leaves were harvested before flowering and S fertilization (**Fig. 4a**, field experiment 2). The second set corresponds to 56 other commercial crops located in Calvados (Lower Normandy, France) and for which leaves were harvested after flowering and S fertilization (**Fig. 4b**, field experiment 3). In the first case (**Fig. 4a**), the use of the threshold values suggested that 27, 33 and 40% of the crops analyzed before flowering would be classified as S sufficient, at risk of S deficiency or as S deficient, respectively. After flowering (**Fig. 4b**), 9, 36 and 55% of the analyzed crops fell into the previously cited groups.

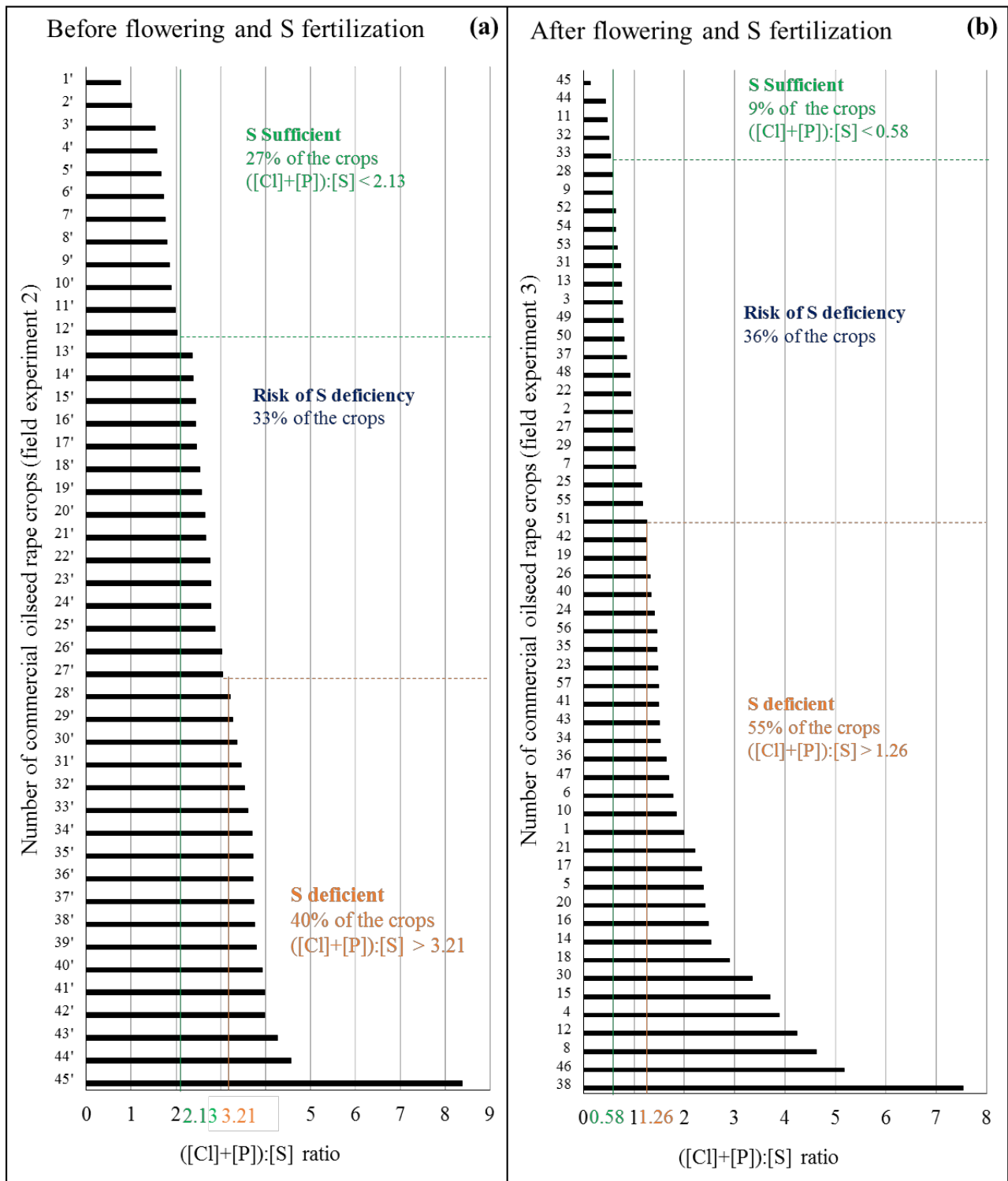


Fig. 4 Commercial oilseed rape crops (Field experiments 2 and 3) classified according to decreasing values of the $[(Cl)+[P]]:[S]$ ratio in mature leaves quantified (a) before flowering and S fertilization (Field experiment 2 using 45 commercial crops from different locations in France, see SD1) or (b) after flowering and S fertilization (Field experiment 3 using 56 commercial crops localized in Calvados, Lower Normandy, France). Threshold values of the $[(Cl)+[P]]:[S]$ ratio classified these oilseed rape crops into three S status groups: S deficient, at risk of S deficiency and S sufficient plants.

In order to test if the $([Cl]+[P]):[S]$ ratio and associated thresholds take into account the availability of soil S and its interaction with the rate of S fertilization, the mature leaves and the soil of four crops derived from field experiment 2 (*i.e.* crops # 8', 11', 20' and 36' represented in **Fig. 4a and supplemental data SD1**) were harvested and analyzed before and after S fertilization (**Table 2**). However, it must be stressed that soil S content on its own cannot totally reflect the S available to the plants. These four oilseed rape crops were then classified within three groups (from S deficient to S sufficient) according to the $([Cl]+[P]):[S]$ ratio, determined before and after S fertilization. It was found that before flowering and S fertilization, the lower S content in the soil, the higher the $([Cl]+[P]):[S]$ ratio and *vice versa*, which validated the possibility of using the $([Cl]+[P]):[S]$ ratio as an indicator of sulfur status (**Table 2**). After S fertilization (from 0 to 100kg S ha⁻¹), the $([Cl]+[P]):[S]$ ratio was decreased partly due to plant development (see crop # 11' without S fertilization in **table 2** as well as data of experiment 1 **fig. 3a and c**) but mostly as a result of the S fertilization rate. For example, crop # 20', classified at risk of S deficiency before S fertilization, received 100 kg S ha⁻¹ which decreased its $([Cl]+[P]):[S]$ ratio by 78% (from 2.64 to 0.59) and thus ascribed it to the sufficient S availability group (lower limit of group at risk of S deficiency). Overall, the simple use of the leaf $([Cl]+[P]):[S]$ ratio before fertilization on these four crops indicated that crops # 8' and 11' would not have required any S fertilization. Nevertheless, the decrease in this ratio after flowering suggested that these crops were S deficient with little or no S fertilization. While crops # 36' and 20' seemed to require S fertilization, crop # 36' would have required a higher dose of S.

IV. Discussion

As previously reported, oilseed rape requires fairly high levels of S in order to maintain yield and seed quality (McGrath and Zhao 1996; Malhi *et al.* 2007; D'Hooghe *et al.* 2014). Since a general S oligotrophication in cultivated soils has been described (Zhao *et al.* 1999; Blake-Kalff *et al.* 2001; Scherer 2001; McNeill *et al.* 2005), S fertilization is usually provided to oilseed rape, but less frequently on other cultivated crops. Moreover, the dose used or recommended does not take into account the real needs of the plants and growth potential. This can lead to excessive or insufficient S fertilization (Sarda *et al.* 2014). Hence, the development of new diagnostic tools of S deficiency, usable under field conditions, is required. The aims of this work were to identify and validate a diagnostic tool derived from early physiological processes occurring during oilseed rape adaptations to S deficiency. These processes are the early mobilization of leaf vacuolar SO₄²⁻ and the osmotic compensation through the accumulation of other anions in the vacuole (Sorin *et al.* 2015).

Table 2 Soil type, soil S content (mg S kg⁻¹), S and N fertilization managed by the farmers (kg S or N ha⁻¹) and the value of the ([Cl]+[P]):[S] ratio in mature leaves harvested before or after fertilization in four oilseed rape commercial crops from field experiment 2 (crops # 36', 20', 11' and 8'). Status of crops have been determined within three groups (S deficient, at risk of S deficiency and S sufficient) according to threshold values of the ([Cl]+[P]):[S] ratio. Data are given as mean ± SE (n=3). *, ** and *** indicate significant difference before and after fertilization for $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively. Letters when different indicate significant differences between crops at a given date, at $P<0.05$.

Crops number	Soil type	Soil S content (mg kg ⁻¹)	Before flowering and fertilization		S - (N) fertilizations (kg S - N ha ⁻¹)	After flowering and fertilization	
			([Cl]+[P]):[S] ratio	Status of crops		([Cl]+[P]):[S] ratio	Status of crops
36'	Compact silt	136	3.72 ± 0.43 b	S deficient	10 - (166)	1.54 ± 0.21 b **	S deficient
20'	Superficial clay-limestone	239	2.64 ± 0.13 c	Risk of S deficiency	100 - (146)	0.59 ± 0.10 a ***	S sufficient
11'	Superficial clay-limestone	350	1.99 ± 0.14 a	S sufficient	0 - (110)	1.42 ± 0.05 b **	S deficient
8'	Deep clay-limestone	668	1.80 ± 0.06 a	S sufficient	15 - (151)	1.41 ± 0.24 b	S deficient

IV.1. The $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio as an indicator of S nutrition under field conditions

Under field conditions, the highest Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} contents were found in mature leaves of plants with the lowest S fertilizations having the lowest SO_4^{2-} content and hence the $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio (**Fig. 1a-i**). These higher contents of Cl^- , NO_3^- and PO_4^{3-} might help to maintain the osmotic potential when SO_4^{2-} is mobilized from the vacuole of mature leaves (**Fig. 1d-f**). This is consistent with previous data obtained under hydroponic conditions (Sorin *et al.* 2015). It was also found that leaves of plants grown under field conditions have accumulated Cl^- with the same order of magnitude that was previously found under hydroponic conditions. Indeed, oilseed rape leaves of field grown plants accumulated anions in the same range of concentrations found under hydroponic conditions: 2-16 mg $\text{Cl}^- \text{ g}^{-1}$ DW (4-20 mg $\text{Cl}^- \text{ g}^{-1}$ DW under hydroponic culture), 0.1-3 mg $\text{PO}_4^{3-} \text{ g}^{-1}$ DW (2-7 mg $\text{PO}_4^{3-} \text{ g}^{-1}$ DW under hydroponic culture) and 1-37 mg $\text{SO}_4^{2-} \text{ g}^{-1}$ DW (2-42 mg $\text{SO}_4^{2-} \text{ g}^{-1}$ DW under hydroponic culture). Only NO_3^- was found to accumulate in leaves at a much lower level under field conditions (0.1-5 versus 40-70 mg $\text{NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ DW under hydroponic culture). The same range of NO_3^- contents in mature leaves has been previously reported by Blake-Kalff *et al.* (2000a) and Sarda *et al.* (2014) in oilseed rape grown under field conditions. Nevertheless, the $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio was able to significantly differentiate plants receiving different doses of S fertilization under field conditions as soon as 15 days after S supply (**Fig. 1g-i**). This ratio was also found to be sensitive to N fertilization. Janzen and Bettany (1984) and Zhao *et al.* (1993) reported that higher N fertilization increased plant growth rates and consequently S requirements and hence may aggravate the S deficiency of oilseed rape plants. Reflecting these data, in our study an increase in the $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio with the highest N fertilization (**Fig. 1h-i**) was observed and indicated higher requirements for S.

In order to expand the potential use of this ratio to other plant species, *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *M. truncatula* and *S. lycopersicum* were grown under controlled conditions and submitted to S deficiency (**Table 1**). Whatever the species, the leaf $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio was significantly and precociously increased by reduced SO_4^{2-} availability in nutrient solutions, resulting from a disappearance in SO_4^{2-} in leaves that was accompanied by an increase in $(\text{Cl}^-+\text{NO}_3^-+\text{PO}_4^{3-})$ content. These results strongly suggest that this ratio could be used as a diagnostic tool for a wide range of cultivated plant species.

IV.2. Using the $[(\text{Cl}^-)+(\text{P})]:[\text{S}]$ ratio instead of the $[(\text{Cl}^-)+(\text{NO}_3^-)+(\text{PO}_4^{3-})]:[\text{SO}_4^{2-}]$ ratio

Because Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} and SO_4^{2-} cannot be quantified with enough accuracy with simple methods such as colorimetric test strips, another aim of this study was to find a way to simplify the analysis of this anionic ratio. The first step was to determine if the leaf contents of anions and their respective elements were correlated. Due to their consequent accumulation in their mineral form and the resulting strong linear correlations between anions and elements (Fig. 2a-c), quantification of elements such as Cl, P or S can provide an easy way to determine accurately the Cl^- , PO_4^{3-} and SO_4^{2-} contents in leaf tissues. As NO_3^- was not massively accumulated in leaves of plants grown under field conditions (Blake-Kalff *et al.* 2000a; Sarda *et al.* 2014), we found that the $[(\text{Cl}^-)+(\text{NO}_3^-)+(\text{PO}_4^{3-})]:[\text{SO}_4^{2-}]$ and $[(\text{Cl}^-)+(\text{P})]:[\text{S}]$ ratios were highly correlated by a second-degree polynomial equation (Fig. 3a). This curve plateaued for the highest ratios and it may be suggested that this was due to NO_3^- accumulation that occurred in extreme situations such as in leaves of plants receiving high N fertilization without S supply. This $[(\text{Cl}^-)+(\text{P})]:[\text{S}]$ ratio was measured accurately by handheld XRF spectrometry, directly from ground dry leaf samples, which could be done within a few minutes in the field. Another advantage of quantifying elements instead of anions relies on the fact that the plant samples can be stored for several hours or days after harvest without affecting elementary quantification, which will not be the case with anions.

IV.3. Putative thresholds of the $[(\text{Cl}^-)+(\text{P})]:[\text{S}]$ ratio

A successful diagnostic indicator as defined by Blake-Kalff *et al.* (2000a) needs to show a large response to different S fertilizations, remain stable during development, and be relatively easy to measure with little effort and with great accuracy. Most of these criteria are respected by the $[(\text{Cl}^-)+(\text{P})]:[\text{S}]$ indicator. The precaution to be taken with this indicator is the use of threshold values depending on the developmental stage. According to Melsted *et al.* (1969), threshold values should never be considered as absolute, but as a representation of a possible range resulting from uncontrolled or unknown variables. Having an index of nutrition with constant threshold values at different growing stages has already been questioned (Scaife and Burns 1986; Zhao *et al.* 1999). In this study, two threshold values for the two groups of development stages have been determined, allowing classification of crops into three S status groups: S deficient, at risk of S deficiency and S sufficient, with the additional intermediate class taking into account the area of uncertainty. The survey of the S status of 45 commercial oilseed rape crops in France, field experiment 2, has enabled mapping of their locations according to S requirements (Supplemental data SD1). The crops located

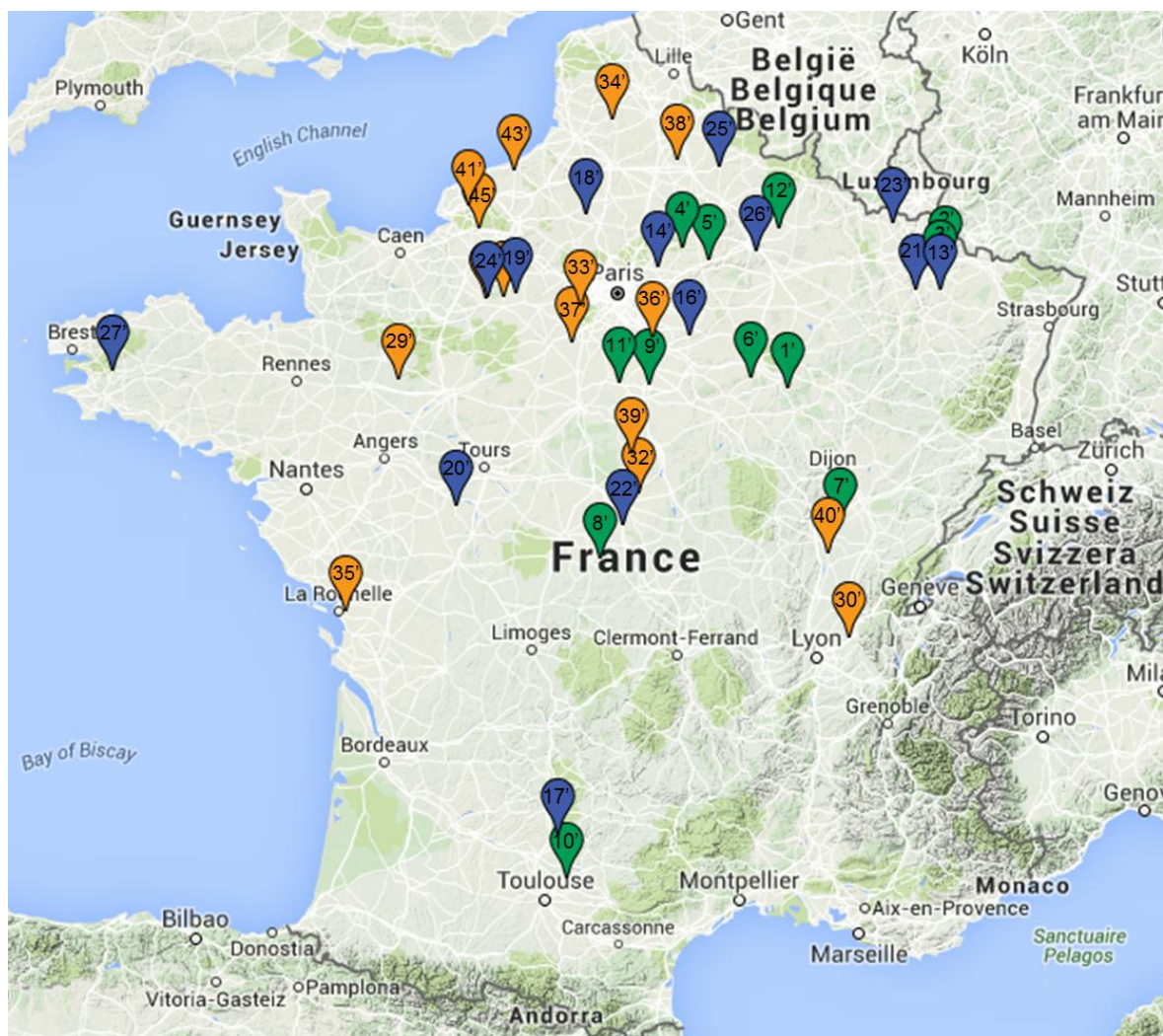
in the north east of France, which corresponds to the cereal plain, was mostly S sufficient. Other areas were more subject to S deficiency. The use of the $([Cl]+[P]):[S]$ ratio at the end of oilseed rape development could be complemented with other S nutrition indicators such as yield, quality or the N:S ratio in seed, so to confirm whether fertilization had been applied correctly. Indeed, at the end of oilseed rape development a high ratio corresponding to low S contents and/or high P and Cl contents in mature leaves may characterize a good remobilization of S to reproductive organs. Previous studies have shown that in response to a moderate S deficiency or a decrease in S availability during late stage of reproductive development, oilseed rape is able to maintain its growth and its yield components by increasing remobilization of previously stored S (especially SO_4^{2-}) in leaves (Dubousset *et al.* 2010; Abdallah *et al.* 2011). This was probably the case for crops # 8' and # 11' (Table 2), which were classified as S sufficient before flowering and with little or no S fertilization, whereas they were classified as S deficient after flowering. The example of these two crops also suggests that the determination of soil S content is not reliable on its own to predict the plant S status, and which highlights the need for indicators at the plant level. Nevertheless, when crops were classified as S sufficient after flowering, for example crop # 20' (Table 2), S reserves remained in mature leaves despite the remobilization and this confirmed that the S requirement had been satisfied until the end of oilseed rape development.

V. Conclusions

This study firstly showed that the accumulation of anions such as Cl^- , NO_3^- and PO_4^{3-} in response to SO_4^{2-} remobilization triggered by S deficiency also occurred in oilseed rape grown under field conditions as previously shown in hydroponically grown plants. The same process was also found in species of different families. The derived leaf elementary ratio, $([Cl]+[P]):[S]$, seems to be a reliable means to detect S deficiency under field conditions. Measurement of this ratio by XRF presents the advantage of requiring only one measurement to be performed on ground dry matter, which could easily be done under field conditions. Its use as a diagnostic tool of plant S nutrition requires accurate threshold values to adjust S fertilization accordingly. A determination method for these threshold values was suggested but will need to be tested at a larger scale (larger number of crops, adaptation to other cultivated species). Finally, the S fertilizer recommendation derived from this indicator will have to be verified *a posteriori* on yield measurement and/or seed quality.

Acknowledgements

The authors thank M. Chédeville for providing the experimental site at Ondefontaine and for technical help to fertilize plots, and all farmers identified by DATAGRI who collaborated in this study. We are also grateful to Vegenov for their participation in the multispecies experiment. Acknowledgements go to the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for the element analysis used in this study and more particularly Marie-Paule Bataillé, Frédérine Marie and Josette Bonnefoy. We thank Dr Laurence Cantrill for improving the English in the manuscript. This work, conducted through the SERAPIS project, was supported by the Regional Council of Lower Normandy (grant number 12P03057), the Regional Council of Brittany (grant number 12008011), the European Regional Development Fund (grant number 33525) and the Centre Mondial d'Innovation – Groupe Roullier.



Supplemental data SD1 Location of 45 commercial crops in France of field experiment 2 with crops classified into three S status groups: S deficient in orange, at risk of S deficiency in blue and S sufficient in green.

Supplemental data

Supplemental data SD2: Multispecies experiment under controlled conditions.

B. napus and *Z. mays*

Seeds of *B. napus* L. cv Boheme and *Z. mays* cv Ronaldinio were germinated on perlite over demineralized water for seven days in the dark and then five days under natural light. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to hydroponic conditions (18 seedlings per 20L-plastic tank) in a greenhouse, between October and December for *B. napus* and between March and April for *Z. mays*, with a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night). Natural light was supplemented with high-pressure sodium lamps (Master Greenpower T400W, Philips, Amsterdam, Netherlands) ($350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation at the canopy height) for 16h. The aerated nutrient solution contained: 3.75 mM KNO_3 , 0.5 mM MgSO_4 , 0.5 mM CaCl_2 , 0.25 mM KH_2PO_4 , 0.2 mM EDTA-2NaFe, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM CuSO_4 , 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.1 μM CoCl_2 , 0.04 μM NiCl_2 and was buffered to pH 6.6 with 0.91 mM CaCO_3 . This solution was renewed according to the rate of NO_3^- depletion monitored daily by using NO_3^- test strips (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) in order to maintain optimal nutrition conditions. After four weeks of growth for *B. napus* and 8 days for *Z. mays*, plants were separated into two batches supplied with a modified nutrient solution chosen in order to achieve S deficiency and to maintain the same concentration of other nutrients (**Supplemental data SD3**): (i) control plants were grown with 508.7 μM SO_4^{2-} , (ii) S limited plants were grown with 8.7 μM SO_4^{2-} . Nutrient solutions were renewed also according to NO_3^- depletion by monitoring the NO_3^- level in the tank.

T. aestivum

Seeds of *T. aestivum* L. cv Sankara were germinated on perlite over demineralized water for five days in the dark and then five days under light. Seedlings were transferred to hydroponic conditions (30 seedlings per 7L-plastic tank) in a growth chamber, with a thermoperiod of 22°C (day) and 18°C (night). Plants received artificial light provided by neon lamps (Lumilux cool daylight, 36W, Osram, Munich, Germany) ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation at the canopy height) for 12h. The aerated nutrient solution contained: 2 mM KNO_3 , 1 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.5 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA-2NaFe, 23 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 2 μM ZnSO_4 , 0.9 μM CuSO_4 , 0.3 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.1 μM CoCl_2 and was buffered to pH 6 with KOH. This solution was renewed every two or three days. After 11 days of growth, plants were separated into two batches: (i) control

plants were grown with $507.9 \mu\text{M SO}_4^{2-}$, (ii) S limited plants were grown with $7.9 \mu\text{M SO}_4^{2-}$, replacing MgSO_4 by MgCl_2 .

B. oleracea

B. oleracea plants cv Nikolas were grown individually in pots filled with a mixture of perlite: vermiculite (v:v, 1:1) in 1L pots for one month then in 2L pots for one month and finally in 8L pots for four months. The first part of the growth period, plants were grown in a growth chamber, with temperatures of 20°C during the day and 18°C during the night, a 14h photoperiod and a mean photosynthetically active radiation of $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ guaranteed by the use of neon lamps (Lumilux soft white, L58W/840, Osram, Munich, Germany). Then plants were vernalized for two weeks at 10°C with a photoperiod of 12h. During the second part of the growth period, plants were transferred to a greenhouse with natural light and temperature controlled at 18°C during the day and 10°C during the night. Plants were watered throughout the experiment, every two days in the growth chamber and every day in the greenhouse, with a nutrient solution composed of 4.5 mM KNO_3 , 3.6 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.4 NH_4NO_3 , 0.3 mM MgSO_4 , 0.1 mM MgCl_2 , 1 mM KH_2PO_4 , 35 mg l^{-1} Fe-EDTA (FerVeg E13, Angibaud et spécialité, La Rochelle, France) and 3.5 mg l^{-1} OligoMix (Oligoveg S2, Angibaud et spécialité, La Rochelle, France). For S deficiency treatment the same solution described above was used except that MgSO_4 was removed and MgCl_2 was adjusted to 0.5 mM.

S. lycopersicum

S. lycopersicum cv Plaisance s/ Emperador was grown in a greenhouse between July and December under natural light temperatures controlled to 20°C during the day and 15°C during the night. Two plants were cultivated per rockwool segment (Grotop, Grodan, Roermond, Netherlands) and were watered every day by a nutrient solution containing: 1.3 mM KNO_3 , 4.1 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.7 NH_4NO_3 , 1.9 mM $\text{K}_2(\text{SO}_4)$, 1.8 mM KH_2PO_4 , 2.2 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, 1.1 mM CaCl_2 , 15 mg l^{-1} Fe-EDTA (FerVeg E13, Angibaud et spécialité, La Rochelle, France) and 2.5 mg l^{-1} OligoMix (Oligoveg S2, Angibaud et spécialité, La Rochelle, France). For S deficiency treatment $\text{K}_2(\text{SO}_4)$ was reduced to 0.2 mM and KNO_3 was adjusted to 4.7 mM.

M. truncatula

M. truncatula plants (Gaertn. A17 genotype) were grown in a randomized complete-block design in a greenhouse temperature controlled to 20°C during the day and 18°C during the night. Artificial lighting was used to ensure 16h light per day: 400 W sodium lamps, three lamps in 17.32 m^2 ,

radiation in the range 400-700 nm, and photosynthetic characteristics of $695 \mu\text{mol s}^{-1}$. A number of mature seeds exceeding about twice the number of plants needed were scarified, imbibed with water for one day at room temperature, and then vernalized four days at 5°C . After vernalization, seeds were germinated at room temperature for one day and then placed on a small float raft system in the greenhouse. The germinated seeds were then set into small holes cut into styrofoam, with their radicle growing into the nutrient solution described in Zuber *et al.* (2013) containing 4 mM KNO_3 , 4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.3 mM MgSO_4 , 0.9 mM MgCl_2 , 0.2 mM NaCl , $0.72 \mu\text{M}$ Na_2MoO_4 , 0.10 mM EDTA-2NaFe , $8.2 \mu\text{M}$ MnCl_2 , $1 \mu\text{M}$ CuCl_2 , $1 \mu\text{M}$ ZnCl_2 , $30 \mu\text{M}$ H_3BO_3 , and 1 mM K_2HPO_4 (pH adjusted to 6.3 using H_3PO_4 before addition of K_2HPO_4). Homogeneous plantlets with two well-formed trifoliate leaves were then individually grown in 3L buckets under hydroponic conditions with vigorous aeration in the solution described above. For applying S deficiency (at a mid-vegetative stage characterized by the appearance of tertiary branches, the S1 stage in Zuber *et al.* 2013), the pots were rinsed with deionized water and then filled with the solution described above except that SO_4^{2-} was replaced by 1.16 mM MgCl_2 .

Supplemental data SD3: Composition of the two nutrient solutions used for control and S deprivation during the treatment period of *B. napus* and *Z. mays*. Nutrient concentrations are expressed in mM.

Nutrients	Control	S deprivation
KNO_3	3.75	3.75
KH_2PO_4	0.25	0.25
EDTA, 2NaFe	0.20	0.20
MgSO_4	0.50	0
CaCl_2	0.50	0
MgCl_2	0	0.50
CaCO_3	0.91	1.41
H_3BO_3	1.4×10^{-2}	1.4×10^{-2}
MnSO_4	5×10^{-3}	5×10^{-3}
ZnSO_4	3×10^{-3}	3×10^{-3}
CuSO_4	7×10^{-4}	7×10^{-4}
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	7×10^{-4}	7×10^{-4}
CoCl_2	1×10^{-4}	1×10^{-4}
NiCl_2	4×10^{-5}	4×10^{-5}

Chapitre V

Le transport racinaire aspécifique de certains éléments minéraux permet l'identification d'indicateurs nutritionnels précoces : le cas du sulfate et du molybdate



Chapitre V

Le transport racinaire aspécifique de certains éléments minéraux permet l'identification d'indicateurs nutritionnels précoces : le cas du sulfate et du molybdate

Préambule

Nos travaux antérieurs, en accord avec les données de la littérature, démontrent que l'une des premières réponses du colza à une limitation S, consiste à augmenter de façon très précoce et massive, l'expression des gènes codant des transporteurs racinaires de sulfate. Ces transporteurs étant susceptibles de transporter aussi du molybdate, nous avons alors cherché à déterminer la pertinence de l'utilisation d'un ratio [Mo]:[S] foliaire en tant qu'indicateur précoce du statut de nutrition soufrée chez le colza, en conditions contrôlées et de plein champ ainsi que chez d'autres espèces cultivées.

Résultats majeurs :

L'accumulation foliaire de Mo intervient dès le premier jour d'une privation en S, avant même une baisse significative des teneurs en S. La dynamique d'accumulation du Mo est étroitement corrélée à la cinétique d'induction du gène codant le transporteur *BnaSultr1.1*. En conditions de plein champ, les teneurs en Mo augmentent dans les feuilles lorsque la fertilisation soufrée est réduite. Le ratio [Mo]:[S] foliaire, différenciant ainsi significativement les parcelles selon leur niveau de fertilisation S, se révèle être un indicateur pertinent et précoce pour diagnostiquer le statut de nutrition soufrée du colza. Il semble également être utilisable chez d'autres espèces végétales. Des valeurs seuils de ce ratio sont testées afin de classer les parcelles de colza comme ayant un statut suffisant en S, à risque ou déficient en S.

Ces travaux sont présentés dans le chapitre suivant correspondant à un projet d'article intitulé « Non-specific root transport of nutrient gives access to an early nutritional indicator: the case of sulfate and molybdate », qui sera soumis à Journal of Experimental Botany, dès lors que les contraintes de confidentialité seront levées (dépôt de brevet en cours).

Non-specific root transport of nutrient gives access to an early nutritional indicator: the case of sulfate and molybdate

Elise Sorin^{1,2,3,4*} - Anne Maillard^{1,2,3*}, Philippe Etienne^{1,2,3}, Sylvain Diquélou^{1,2,3}, Stanislav Kopriva⁵, Mustapha Arkoun⁴, Karine Gallardo⁶, Florence Cruz⁴, Jean-Claude Yvin⁴, Alain Ourry^{1,2,3}.

¹Normandie Université, Caen, France

²UNICAEN, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

³INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

⁴Centre Mondial d'Innovation, CMI, Groupe Roullier, 27 Avenue Franklin Roosevelt, 35400 Saint-Malo, France

⁵University of Cologne, Bot Inst & Cluster Excellence Plant Sci, D-50931 Cologne, Germany

⁶INRA, UMR1347 Agroécologie, Pôle GEAPSI, F-21000 Dijon, France

*The two first authors had an equal contribution

Corresponding author: Alain Ourry, Normandie Université – INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France. Phone: +33 231 565 653; Fax: +33 231 565 360; Email: alain.ourry@unicaen.fr.

In preparation for submission to Journal of Experimental Botany.

Abstract

Under sulfur (S) deficiency, crosstalk between nutrients induced accumulation of other nutrients, particularly molybdenum (Mo). This disturbed balance between S and Mo could provide a way to detect S deficiency and therefore avoid losses in yield and seed quality in cultivated species. Under hydroponic conditions, S deprivation was applied to *Brassica napus* to determine the precise kinetics of S and Mo uptake and whether sulfate transporters were involved in Mo uptake. Leaf contents of S and Mo were also quantified in a field-grown S deficient oilseed rape crop with different S and N fertilization applications to evaluate the [Mo]:[S] ratio, as an indicator of S nutrition. A large set of commercial crops was then assessed to detect potential cases of S deficiency in France. To test genericity of this indicator, the [Mo]:[S] ratio was also assessed with other cultivated species under different controlled conditions. During S deprivation, Mo uptake was strongly increased in *B. napus*. This accumulation was not a result of the induction of the molybdate transporters, Mot1 and Asy, but could be a direct consequence of Sultr1.1 induction. Under field conditions, Mo content was also increased in leaves by a reduction in S fertilization. The [Mo]:[S] ratio significantly discriminated between the plots with different rates of S fertilization. Threshold values were estimated for the hierarchical clustering of commercial crops according to S status. The use of the [Mo]:[S] ratio was also reliable to detect S deficiency for other cultivated species under controlled conditions. The analysis of the leaf [Mo]:[S] ratio seems to be a practical indicator to detect early S deficiency under field conditions and thus improve S fertilization management.

Key words

Brassica napus, Molybdenum, S nutrition, Sulfur, *Triticum aestivum*

Abbreviations

DW: dry weight, HR ICP-MS: high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry, STAS: sulfate transporter and anti-sigma domain.

I. Introduction

It is usually assumed that plants need to maintain a certain level of homeostasis between mineral nutrients. As a consequence, plants must constantly acquire nutrients from soil solution by a complex network of root specific transporters whose expression is usually up-regulated during deficiency (See Nacry *et al.*, 2013 for N, Ashley *et al.*, 2005 for K, Hawkesford, 2003 for S). However, some nutrients might compete for the active site of non-specific transporters (Malvi, 2011). For example, non-selective cation uptake systems that are able to transport both Na⁺ and K⁺ have been identified in plant root cells, such as HKT1 (a high affinity K⁺ transporter), LCT1 (a low-affinity cation transporter) or NSC (non-selective cation channels) (Shachtman and Liu, 1999). As a consequence, at higher levels of Na⁺, plants will take up Na⁺ instead of K⁺ (Malvi, 2011). Another case of interactions between competitive ions present in the rhizosphere concerns sulfate (SO₄²⁻), molybdate (MoO₄²⁻), selenate (SeO₄²⁻) and tungstate (WO₄²⁻) (Shinmachi *et al.*, 2010; Schiavon *et al.*, 2012). Molybdate uptake has long been assumed to occur through the sulfate transporters (Mendel, 2005; Schiavon *et al.*, 2012). Indeed, these two anions are chemical analogs and both possess a double negative charge, a tetrahedral structure, a similar size, and hydrogen-bonding properties (Dudev and Lim, 2004; Bittner, 2014) and therefore may compete for the binding site of the same transporters (Alhendawi *et al.*, 2005).

The sulfate transporter family consists of 14 genes in *Arabidopsis* that can be subdivided into five groups according to sequence similarities (for review see Hawkesford, 2003; Kopriva *et al.*, 2009). The members of the first group, showing a high-affinity for sulfate, are assumed to be principally responsible for primary root uptake. The members of the second group are also localized in the root and shoot tissues and are considered as low-affinity sulfate transporters, while the transporters of the third group are localized in leaf tissues. To date, the specific role of the latter group needs to be clarified. Transporters of group four are localized in the tonoplast and are assumed to be responsible for the efflux of sulfate from the vacuoles into the cytoplasm (Kopriva *et al.*, 2009). A fifth group comprising two isoforms in *Arabidopsis* (*AtSultr5.1* and *AtSultr5.2*) has been proposed but their sequences are considerably shorter, around 450 amino acids, compared to nearly 650 amino acids for the other groups (Hawkesford, 2003) and they do not include the sulfate transporter anti-sigma domain (STAS), which is critical in the transport of sulfate and the stability of transporters (Llamas *et al.*, 2011). Thus, this latest group is different enough to be considered as an independent family (less than 13% identity with other groups) (Llamas *et al.*, 2011). Most sulfate transporters (for example *Sultr1.1*, *Sultr1.2*, *Sultr2.1*, *Sultr4.1* and *Sultr4.2*) are strongly up-regulated by S deficiency through increased gene expression as demonstrated in numerous plant species (Takahashi *et al.*, 2000; Abdallah *et al.*, 2010; Shinmachi *et al.*, 2010; Parmar

et al., 2007; Casieri *et al.*, 2012). Fitzpatrick *et al.* (2008) found that uptake of molybdate in *Stylosanthes hamata* can be achieved by SHST1, a high-affinity sulfate transporter from group 1. Molybdate uptake was not reduced when challenged with a competitive anion such as sulfate, whereas the sulfate uptake *via* SHST1 was reduced in presence of molybdate (Fitzpatrick *et al.*, 2008). Another transporter from group 5, previously annotated SULTR5.2, was then identified as the first molybdate transporter in *Clamydomonas reinhardtii* (Tejada-Jimenez *et al.*, 2007) and *Arabidopsis* (Tomatsu *et al.* 2007; Baxter *et al.*, 2008; Bittner, 2014) and was therefore renamed MOT1. However, the localization and the involvement of MOT1 in the uptake of molybdate remain unclear. Indeed, Tomatsu *et al.* (2007) reported the localization of MOT1 in plasma membranes and in vesicle membranes, while Baxter *et al.* (2008) established its localization in the mitochondria. A second molybdate transporter, MOT2 (previously named SULTR5.1) was then identified in *Arabidopsis* as being involved in molybdate export from vacuole to cytosol, especially during translocation of molybdate into maturing seeds (Gasber *et al.*, 2011; Bittner, 2014). Another molybdate transporter also named CrMOT2 has been described in *Chlamydomonas reinhardtii* (Tejada-Jimenez *et al.*, 2011) and is different from its namesake described previously. The knockdown expression of this *CrMot2* gene leads to a reduction of molybdate uptake proportional to the decrease in its transcript level (Tejada-Jimenez *et al.*, 2011). More recently, a homolog of *CrMot2*, (named *Asy* for Abnormal Shoot in Youth) has been reported in higher plants (Hibara *et al.*, 2013). Its localization in the plasma membrane together with the severe phenotypes in *asy* mutants supplied with sufficient Mo suggest that the ASY transporter is crucial for molybdate uptake (Hibara *et al.*, 2013).

Balik *et al.* (2006) have demonstrated an antagonistic relationship between the sulfate and molybdate uptake by plants. Previous studies in *Brassica napus* (Balik *et al.*, 2006) and *Brassica juncea* (Schiavon *et al.*, 2012) showed an accumulation of Mo in response to S limitation. These authors suggested that the repression of sulfate uptake observed under S deficiency could be due to molybdate binding to the active sites of the root sulfate transporters, which was favored by the lack of competition with sulfate. Moreover, Shinmachi *et al.* (2010) showed under field conditions that a significant accumulation of Mo in *Triticum aestivum* plants with low S fertilization was concomitant with the increased expression of root sulfate transporters. It has also been shown that mineral S application leads to a significant decrease in Mo concentration and uptake in *B. juncea* (Schiavon *et al.*, 2012; Harris *et al.*, 2014) and *Brassica oleracea* (Hunashikatti *et al.*, 2000) or that the absence of sulfate in nutrient medium causes a significant accumulation of Mo in *Solanum lycopersicum* (Alhendawi *et al.*, 2005). Considering the effects of S deficiency on the Mo accumulation previously described, it could be hypothesized that the leaf [Mo]:[S] ratio might serve

as an indicator of S nutrition to predict S deficiency. For S-demanding crops such as oilseed rape, S deficiency provokes multiple plant physiological changes leading to losses in yield and seed quality through modified lipid and protein composition of seeds (Janzen and Bettany, 1984; McGrath and Zhao, 1996; Scherer, 2001; Malhi *et al.*, 2007; D'Hooghe *et al.*, 2014). It has already been suggested that the analysis of plants rather than soil via total S, SO_4^{2-} or N:S, malate:sulfate or $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$ ratios could be used to detect plant S requirements (for review see Blake-Kalff *et al.*, 2001; Sorin *et al.*, 2015) but these parameters are affected by growth stage and growth rates or need laboratory analyses, making them unreliable as diagnostic indicators (Blake-Kalff *et al.*, 2000a; Blake-Kalff *et al.*, 2001). It is therefore essential to find an accurate indicator of plant S status that is suitable as a reliable and relevant diagnostic tool under field conditions in order to evaluate the S requirements of *B. napus* and of other important cultivated species in the context of the high risk of S deficiency.

The main objectives of this work were to study the interaction effects between S and Mo uptake and accumulation in oilseed rape. The first objective was to confirm that Mo accumulation occurred during S deprivation in oilseed rape under controlled conditions, with a precise kinetic description of Mo uptake together with the transcript levels of genes encoding sulfate and molybdate transporters. Additionally, the putative molybdate uptake by sulfate transporters was assessed in *Atsultr1.1* and *Atsultr1.2 Arabidopsis* mutants grown under S deficiency. The second objective was then to investigate how the [Mo]:[S] ratio in leaves of oilseed rape grown under field conditions was affected by S and N fertilization, and consequently if it constitutes a relevant early indicator to predict the risk of S deficiency at a larger scale. Finally, the last objective was to test the functionality of the [Mo]:[S] ratio as an indicator of S deficiency in other cultivated species such as *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Solanum lycopersicum* grown under controlled conditions.

II. Materials and Methods

II.1. Hydroponic experiments and tissue sampling

Seeds of *B. napus* L. var. Bohème were germinated on perlite over demineralized water for seven days in the dark and then five days under natural light. Just after the first leaf emergence, seedlings were transferred to hydroponic conditions (18 seedlings per 20L-plastic tank) in a greenhouse, between October and December, with a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night). Natural light was supplemented with high-pressure sodium lamps (Master Greenpower T400W,

Philips, Amsterdam, Netherlands) ($350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation at the canopy height) for 16h. The aerated nutrient solution contained: 3.75 mM KNO_3 , 0.5 mM MgSO_4 , 0.5 mM CaCl_2 , 0.25 mM KH_2PO_4 , 0.2 mM EDTA-2NaFe, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM CuSO_4 , 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.1 μM CoCl_2 , 0.04 μM NiCl_2 and buffered to pH 6.6 with 0.91 mM CaCO_3 . This solution was renewed according to the rate of NO_3^- depletion monitored daily by using NO_3^- test strips (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) in order to maintain optimal nutrition conditions.

After 4 weeks of growth, plants were separated into two batches supplied with a modified nutrient solution chosen in order to achieve S deficiency and to maintain the same concentration of other nutrients: (i) control plants (+S) were grown with 508.7 μM SO_4^{2-} , (ii) S-deprived plants (-S) were grown with 8.7 μM SO_4^{2-} (**Supplemental data SD1**). These nutrient solutions were also renewed according to NO_3^- depletion by monitoring the NO_3^- level in the tank (at the end of the experiment this was about every two days).

Four independent samples each consisting of four individual plants were harvested at day 0 and after 1, 2, 3, 7, 13, 21 and 28 days of treatment. Leaves present at the beginning of treatment applications (d0) were identified and marked, and these organs were referred to as “emerged leaves”, while leaves appearing during treatments were harvested separately as “new emerging leaves”. At each date of harvest, whole roots from control and depleted plants (-S) were also harvested. Thereafter, leaves, petioles and roots were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis. An aliquot of each tissue was freeze-dried for dry weight (DW) determination and ground, using an oscillating grinder (MM400, Retsch, Haan, Germany), to fine powder for element analysis.

II.2. Field experiments and plant sampling

II.2.1. Study of different fertilization rates on an S deficient field

The experimental site was selected from a previous study (Sarda *et al.* 2014) showing an S deficiency in *B. napus* L. grown in 2009. This field of 11.3 ha was located at Ondefontaine, France ($48^\circ59'18.69''$ N, $00^\circ41'56.70''$ W). A winter oilseed rape crop (*B. napus* L., 95% cv DK Exstorm and 5% cv Alicia) was sown with a density of 35-40 plants m^{-2} on 27 august 2013. The previous crop was spring barley (*Hordeum vulgare* L.). Chemical analyses of the loam soil provided an S content of 220 mg kg^{-1} and a pH value of 6.4. Before crop establishment, organic fertilizer (40 $\text{m}^3 \text{ ha}^{-1}$ of bovine manure) was applied to the whole field corresponding to 122 kg N ha^{-1} and 44 kg S ha^{-1} . The field was separated into seven randomized plots fertilized with different doses of N and S mineral

fertilizer. One plot was unfertilized. Other plots were fertilized on 27 February 2014 with three different doses of S fertilizer at 0, 12 and 36 kg S ha⁻¹ with a combined fertilizer comprising ammonium and nitrate and sulfuric anhydride, 26% N and 36% SO₃ and complemented with ammonium nitrate to obtain 65 kg N ha⁻¹ on each plot. Then, on 27 March 2014, a second N fertilization with 60 kg N ha⁻¹ (liquid N containing 50% urea, 25% ammonium and 25% nitrate) was applied to three plots, which thus received 125 kg N ha⁻¹ after two fertilizer applications.

Five harvests were performed between January and July 2014: before fertilization (at the rosette stage and at the start of stem elongation (GS30), January 30th 2014 and February 12th 2014), 15 days after S fertilization (start of the visible bud stage (GS50), March 14th 2014), 47 days after S fertilization (silique formation stage (GS70), April 15th 2014) and finally after 60 days (silique formation stage (GS70), April 28th 2014). Two batches of leaves comprising mature leaves (from the lower canopy) and young leaves (from the higher canopy), each of them consisting of three replicates of 20 leaves, were randomly collected from each plot. Leaves were freeze-dried for DW determination and ground, using an oscillating grinder (MM400, Retsch, Haan, Germany) to fine powder for further analysis.

II.2.2. Study of 45 commercial crops before fertilization and flowering

Forty-five commercial crops of oilseed rape were selected in France according to different locations (given in [Supplemental data SD2](#)), different agricultural practices (dose of fertilizers, previous crop, tillage), and under contrasting soil and climate conditions that may affect SO₄²⁻ leaching and hence SO₄²⁻ availability. The farmers, identified with the help of DATAGRI (Lyon, France), collaborated in the present study. Crops have been numbered arbitrarily, from 1' to 45'. Two batches of leaves comprising mature leaves (from the lower canopy) and young leaves (from the higher canopy), each of them consisting of 20 leaves, were randomly collected from each of the 45 fields in February 2014, just at the end of winter corresponding to the start of stem elongation (GS30) and before fertilization. Leaves were freeze-dried before laboratory processing.

II.3. Multispecies experiment under controlled conditions

In order to assess whether data obtained with *B. napus* could be extrapolated to other species, experiments using *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *S. lycopersicum* and *P. sativum* grown under controlled conditions were conducted under different culture conditions described in

Supplemental data SD3 with optimal and sub-optimal S alimentation. Leaves were harvested and frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C until freeze-drying for further analysis.

II.4. Element analysis by mass spectrometry

For the analysis of total N and S contents, an aliquot of around 4 mg DW of each plant organ sample was placed in tin capsules for total N and S analysis in order to analyze between 60 and 80 µg N. The total N amounts and S amounts in plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Nu Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). The total N or S amount (N_{tot} or S_{tot}) in a tissue “i” at a given time “t” was calculated as:

$$N_{tot} \text{ (or } S_{tot}) = \frac{\% N_{i,t} \text{ (or } S_{i,t}) \times DW_{i,t}}{100}$$

P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mo, Mn, B, Ni and Na in samples were quantified by High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HR ICP-MS, Thermo Scientific, Element 2™, Bremen, Germany) with prior microwave acid sample digestion (Multiwave ECO, Anton Paar, Les Ulis, France) using 800 µL of concentrated HNO₃ (Thermo Fischer, Illkirch, France), 200 µL of H₂O₂ (SCP SCIENCE, Quebec, Canada) 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, gallium and rhodium (SCP SCIENCE, Quebec, Canada), for a final concentration of 10 and 2 µg.L⁻¹, respectively, diluted to 50 ml with Milli-Q water to obtain solutions containing 2.0% (v/v) of nitric acid, then filtered on a 40 µm teflon filtration system (Courtage Analyses Services, Mont-Saint-Aignan, France). Quantification of each element was performed using external standard calibration curves. The quality of mineralization and analysis were checked using a certified reference material of Citrus leaves (CRM, Certified Reference Material, NCS ZC73018, Sylab, Metz, France). The amount of each element in each tissue was then calculated as previously explained for N and S.

II.5. Reverse transcription (RT) and q-PCR analysis

Total RNA was extracted from 200 mg of root and leaf fresh matter as previously described (Sorin *et al.*, 2015). For RT, 1 µg of total RNA was converted to cDNA with an iScript cDNA synthesis kit according to the manufacturer’s protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Q-PCR amplifications were performed using specific primers (**Table 1**) for each housekeeping gene (*EF1-α* and *18S rRNA*) and target genes (*BnaSultr1.1*, *BnaSultr1.2*, *BnaASY*, *BnaMot1*). Q-PCRs were

Table 1: Accession number and Q-PCR primer sets. *EF1- α* and *18S rRNA* were housekeeping genes used for relative gene expression by Q-PCR analysis.

Gene	Accession number	Forward	Reverse
<i>EF1-α</i>	DQ312264	5'-gcctggtatggttgacct-3'	5'-gaagttagcagcacccttg-3'
<i>18S rRNA</i>	X16077	5'-cggataaccgtagtaattctag-3'	5'-gtactcattccaattaccagac-3'
<i>BnaSultr1.1</i>	AJ416460	5'-agatattgcgatcggaccag-3'	5'-gaaaacgccagcaaagaaag-3'
<i>BnaSultr1.2</i>	AJ311388	5'-ggtgtagtcgctggaatggt-3'	5'-aacggagtgggaagagcaa-3'
<i>BnaAsy</i>	XM_009145653	5'-tcacgctcatctccaaagt -3'	5'-agtcctacacagcctcaaa -3'
<i>BnaMot1</i>	NM_128127	5'-ctcgccaggattggactta-3'	5'-agatccccaacacgaacaag-3'

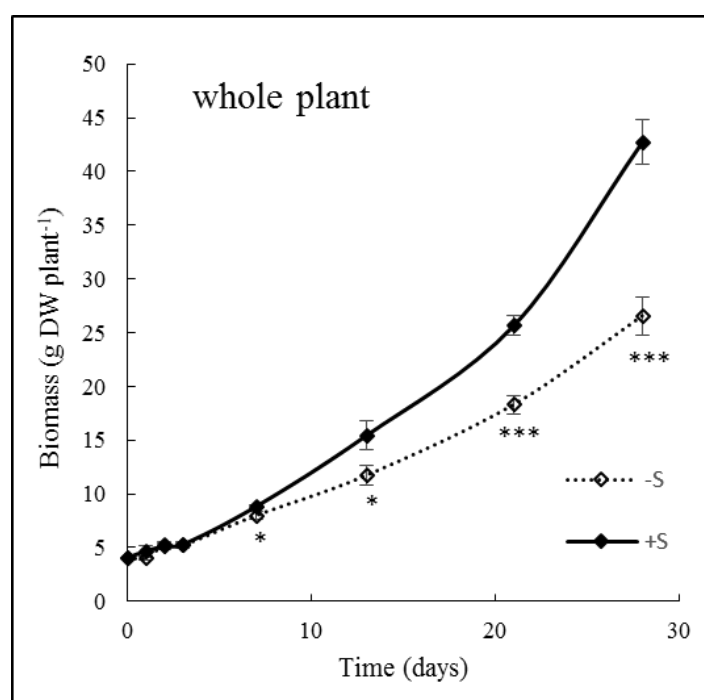


Figure 1: Change in whole plant biomass (g DW plant⁻¹) of *B. napus* L. in control (+S, black line), and S-deprived (-S, dashed line) plants during the 28 days of the experiment. Data are given as the mean \pm s.e. (n=4). *, ** and *** indicate significant difference between control and S-deprived plants for $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

performed with 4 μ l of 100x diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1x SYBR Green PCR Master Mix (Bio–Rad, Marne–la–Coquette, France) in a real-time thermocycler (CFX96 Real Time System, Bio–Rad, Marne–la–Coquette, France). A program of three steps composed of an activation step at 95°C for 3 min and a denaturing step of 40 cycles at 95°C for 15 s followed by an annealing and an extending step at 60°C for 40 s was used for all pairs of primers (Table 1). For each pair of primers, a threshold value and PCR efficiency was determined using a cDNA preparation diluted >10-fold. For all pairs of primers, PCR efficiency was around 100%. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after q-PCRs and by sequencing the q-PCR product to confirm that the correct amplicon was produced from each pair of primers (Eurofins, Ebersberg, Germany). For each sample, the subsequent q-PCRs were performed in triplicate. The relative expression of the genes in each sample was compared with the control sample (corresponding to control plants at d0) and was determined with the delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) method using the following equation: relative expression = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, with $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}}$ and with $\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}$ (for calculations, we considered the geometric mean between Ct of the housekeeping genes), where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification. Using this analysis method, relative expression of the target gene in the control sample was equal to 1 (Livak and Schmittgen, 2001), and the relative expression of other treatments was then compared with the control.

II.6. Statistical analysis

For each measurement, hydroponic experiments on *B. napus* were conducted with four independent biological replicates constituted of four individual plants, except for q-PCR analysis, which was conducted with three biological replicates. Data are given as mean \pm SE for n=4 (or n=3 for q-PCR data). All data of the hydroponic experiment were analyzed by Student's test (Excel software) and marked by one or several asterisks when significantly different between controls and S-deprived plants (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Under field conditions, for the study of different fertilization rates on an S deficient field, three replicates corresponding to a pool of 20 leaves of 20 independent plants were collected. Data are given as mean \pm SE for n=3 and were analyzed by Student's test (Excel software) and marked by different letters when they were significantly different between treatments at a given date, at $P < 0.05$. All experiments on different species in controlled conditions were conducted with four independent biological replicates, except for *P. sativum* culture with three replicates. Data are reported as mean \pm SE for n=4 (or n=3 for *P. sativum* data). All data of the multispecies experiment were analyzed by Student's test (Excel

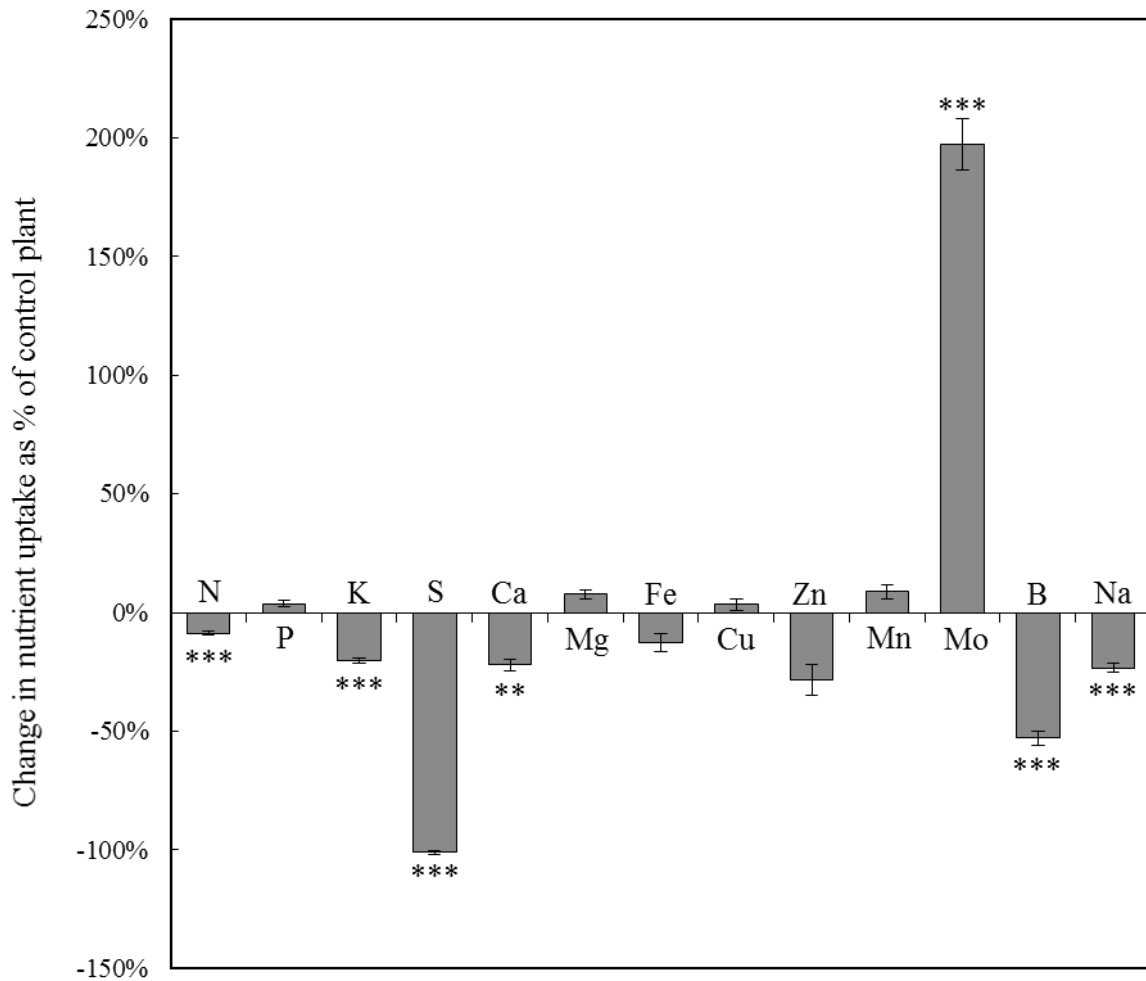


Figure 2: Changes in uptake of macro (N, P, K, S, Ca and Mg) and micronutrients (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, B and Na) in *B. napus* after 21 days of S deprivation. A theoretical uptake by S-deprived plants was calculated for each nutrient, which reflects the uptake expected by S-deprived plants if DW was identical to control plants. Change in nutrient uptake was calculated as the difference between S-deprived and control plants and expressed as % of uptake achieved by control plants. Data are given as the mean \pm s.e. (n=16). *, ** and *** indicate significant differences between control and S-deprived plants for $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

software) and marked by one or several asterisks when significantly different between controls and S-deprived plants (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

III. Results

III.1. S deprivation reduced S, N, K, Ca, B and Na uptake but strongly increased Mo uptake

Plant growth rates were similar for control and S-deprived plants until the 7th day of S deprivation (Fig. 1) and were then significantly reduced. For example, after 21 days, the biomass of S-deprived plants decreased by 29% compared to the biomass of control plants. To overcome the biomass reduction, a theoretical uptake by S-deprived plants was calculated for each nutrient (Fig. 2) using the DW of control plants and the nutrient concentration measured in S-deprived plants. This theoretical uptake reflects the uptake expected by S-deprived plants if DW production was identical to control plants. As expected, after 21 days of S deprivation, S uptake decreased by $-100.7 \pm 0.90\%$ relative to control plants. The uptake of some nutrients was reduced in line with the reduction in the growth rate or more strongly: for N ($-8.7 \pm 1.06\%$), K ($-20.2 \pm 0.88\%$), Ca ($-22.0 \pm 2.41\%$), Na ($-23.4 \pm 1.85\%$) and B ($-52.9 \pm 2.82\%$). Conversely, S deprivation strongly increased the uptake of Mo by $197.0 \pm 10.73\%$. The uptake of P, Mg, Fe, Cu, Zn and Mn were not significantly affected by S deprivation.

III.2. S deprivation strongly and immediately increased uptake of Mo without induction of molybdate transporter genes.

In S-deprived plants, plant S content (Fig. 3A) remained at a nearly steady state level, revealing a lack of significant S uptake from potential trace amounts in the nutrient solution. In control plants, the plant S content steadily increased with time and was significantly higher than in S-deprived plants from 3 days of S deprivation. Plant Mo content (Fig. 3B) increased with time in S-deprived plants, similar to control plants, but at a significantly greater rate; for example by 2.23 fold relative to control after 28 days of S deprivation. From the first day, the Mo content was significantly increased by 28% in S-deprived plants relative to control *i.e.* before a significant difference in S content that occurred after only 3 days. As a consequence, the [Mo]:[S] ratio at the whole plant level (Fig. 3C) significantly increased as early as one day after S deprivation, and was increased by

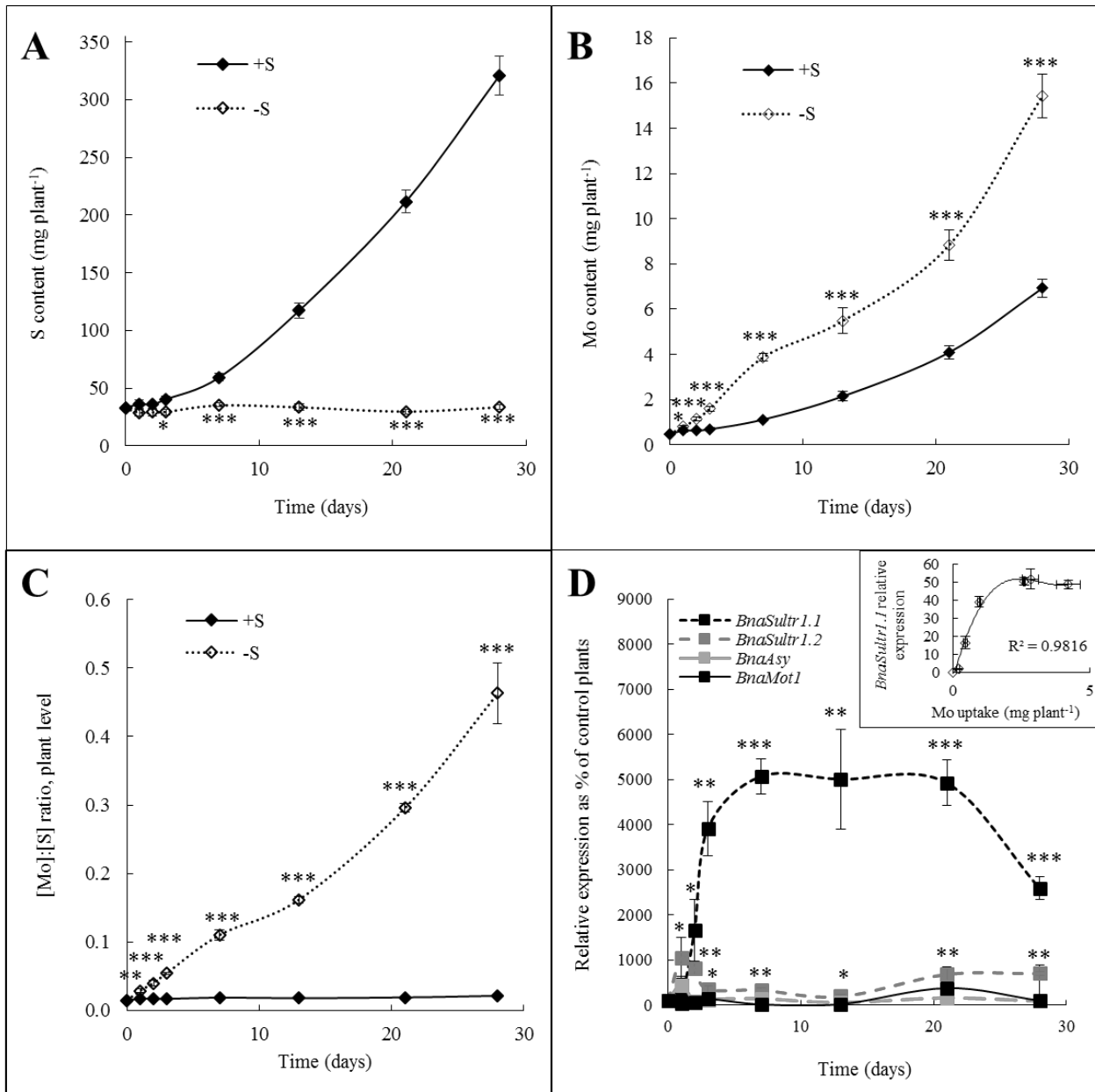


Figure 3: (A) Cumulated S and (B) Mo contents (mg plant⁻¹) in *B. napus* control (+S, black line) or S-deprived (-S, dashed line) plants. (C) Kinetic of the [Mo]:[S] ratio in *B. napus* from control (+S, black line) or S-deprived (-S, dashed line) plants. (D) Effect of S deprivation on relative expression of root transporters: *BnaSultr1.1*, *BnaSult2.1*, *BnaAsy* and *BnaMot1* genes expressed in % of control plants. The insert provides the correlation between Mo uptake and the relative expression of *BnaSultr1.1*. Data are given as the mean \pm s.e. (n=4 or n=3 for q-PCR data). *, ** and *** indicate significant differences between control and S-deprived plants for $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

about 21 fold after 28 days of S deprivation. In control plants, the [Mo]:[S] ratio remained constant as a function of time.

The relative expression of genes encoding different molybdate (*BnaMot1* and *BnaAsy*) and sulfate (*BnaSultr1.1* and *BnaSultr1.2*) transporters was quantified in roots during the 28 days of treatment (Fig. 3D). A very strong accumulation of *BnaSultr1.1* transcripts occurred during the first 7 days and remained at a steady state level between 7 and 21 days. The *BnaSultr1.2* transcript level was also significantly up-regulated, but to a lesser extent than *BnaSultr1.1* in response to S deprivation from the first day of treatment. In contrast, expression of genes encoding root molybdate transporters (*BnaMOT1* and *BnaASY*) (Fig. 3D) was not affected by S deprivation despite the strong increase in Mo uptake by S-deprived plants (Fig. 3B). The relative expression of *BnaSultr1.1* appeared to be correlated with Mo uptake (polynomial order 2, $R^2=0.98$) during the 21 days of S deprivation (insert Fig. 3D).

III.3. In leaves of S-deprived plants, Mo and S contents changed in opposite ways

Under hydroponic conditions, no matter which leaves were assayed (emerged leaves or new emerging leaves), the S content steadily increased with time in control plants (Fig. 4A-B). Predictably and according to deprivation, in emerged leaves from S-deprived plants the S content significantly decreased as early as 2 days after S deprivation (Fig. 4A). The S content decreased with the same pattern in new emerging leaves (Fig. 4B). Molybdenum content steadily increased with time in the two groups of leaves of control plants but the accumulation of Mo was significantly and rapidly (from 1 day) increased by S deprivation and until the end of the experiment (Fig. 4C-D). Compared to control plants, the Mo content in emerged leaves (Fig. 4C) was increased by 197% and 84% after 7 and 28 days of S deprivation, respectively. The increase in Mo content was even more pronounced in new emerging leaves (Fig. 4D) where it increased by 637% and 253% after 7 and 28 days of S deprivation, respectively. In these two groups of leaves, the [Mo]:[S] ratio (Fig. 4E-F) strongly increased with time in S-deprived plants and remained at a constant level in control plants. Indeed, there was significant increase of 45% in the [Mo]:[S] ratio in emerged leaves (Fig. 4E) after the first day of S deprivation and after 28 days this increase reached 1256%. At the same time, the [Mo]:[S] ratio in new emerging leaves (Fig. 4F) was also increased by 3158% in S-deprived plants.

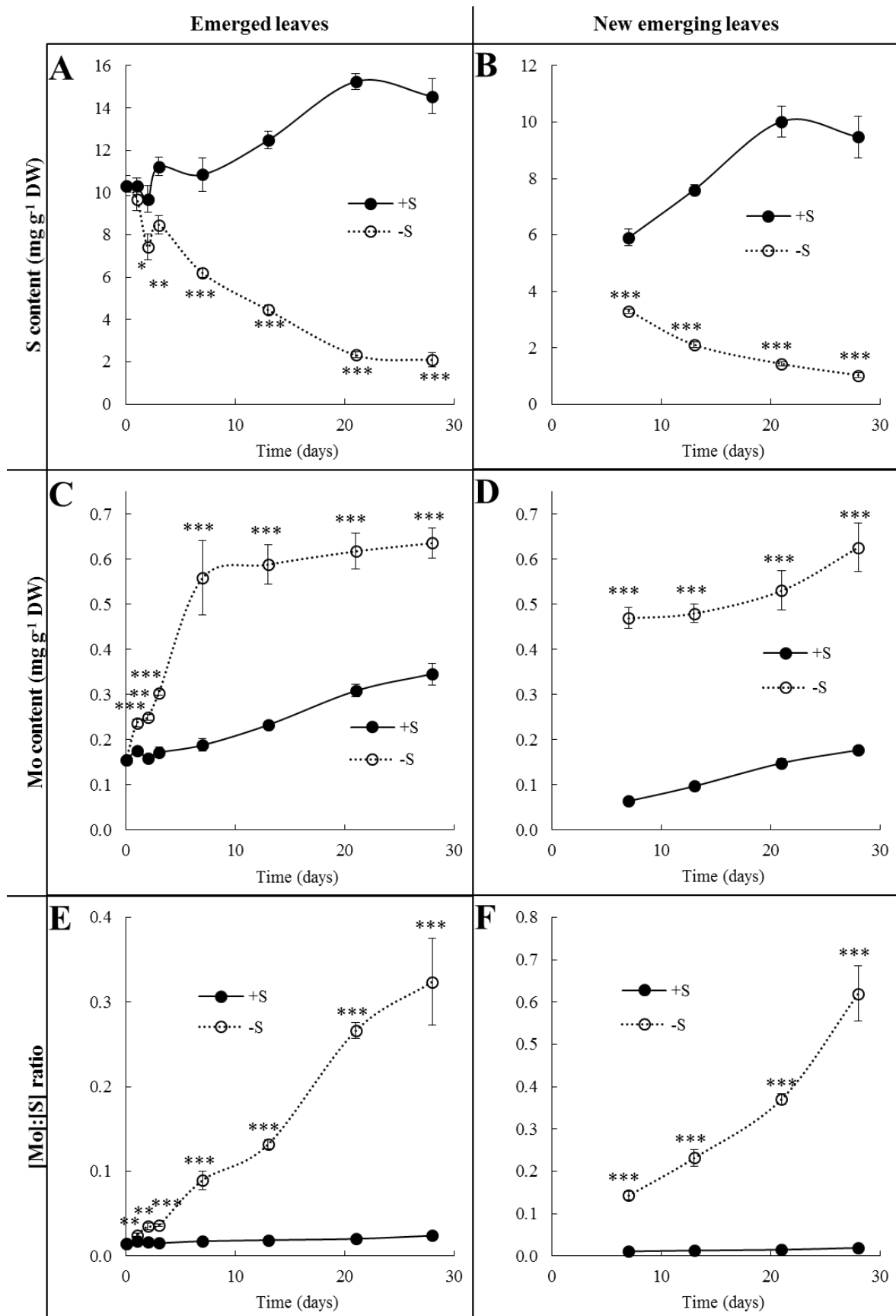


Figure 4: Kinetic of (A-B) S and (C-D) Mo contents (mg g⁻¹ DW) and (E-F) the [Mo]:[S] ratio in emerged (on the left) and new emerging (on the right) leaves of *B. napus* from control (+S, black line) or S-deprived (-S, dashed line) plants. Data are given as the mean \pm s.e. (n=4). *, ** and *** indicate significant differences between control and S-deprived plants for $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

III.4. Under field conditions, lower S availability increased leaf Mo content and hence the [Mo]:[S] ratio

The S content, Mo content and the [Mo]:[S] ratio were also quantified in mature (Fig. 5) and young leaves (Supplemental data SD4) of oilseed rape grown under field conditions, 15, 47 and 60 days after S fertilization. To simplify reading, only the data after 47 days are presented because the results obtained at 60 days showed similar trends. Sulfur content (Fig. 5A-C) was decreased significantly in mature leaves by a reduction in S fertilization (from 36, 12 to 0 kg S ha⁻¹), whatever the level of N fertilization (65 or 125 kg N ha⁻¹). The highest Mo content (Fig. 5D-F) was found in mature leaves of plants receiving N fertilization and with no or low S fertilization (0 or 12 kg S ha⁻¹). The [Mo]:[S] ratio (Fig. 5G-I) differentiated the plots according to S fertilization: 0, 12 and 36 kg S ha⁻¹. Indeed, mature leaves of plants with N fertilization (65 or 125 kg N ha⁻¹) and without S had the highest [Mo]:[S] ratio, whereas mature leaves of plants with 36 kg S ha⁻¹ had the lowest [Mo]:[S] ratio and mature leaves of plants with 12 kg S ha⁻¹ had an intermediate [Mo]:[S] ratio. The same trends were also found in young leaves (Supplemental data SD4) but the effect of S fertilization on the [Mo]:[S] ratio was slightly higher in mature leaves.

Interactions between N and S fertilization were also found. It can be assumed that the growth rate was mostly dependent on the N fertilization rate. For example, 15 days after S fertilization, the biomass of mature leaves was 5.03 ± 0.38 g DW leaf⁻¹ in unfertilized plot whereas in plot with 65 kg N ha⁻¹ and 0 kg S ha⁻¹ the biomass was 6.70 ± 0.01 g DW leaf⁻¹ ($P < 0.01$, data not shown). The supply of N mineral fertilization had a direct negative consequence on S content in leaves as a result of the increased growth rate. Indeed, the leaf S content of unfertilized plants was significantly higher than (Fig. 5A and C) or similar to (Fig. 5B) the S content in mature leaves of plants receiving N fertilization for the same S fertilization rate. Consequently, the Mo content in leaves in unfertilized plot was similar to (Fig. 5D, at 15 days after S fertilization) or significantly lower than (Fig 5.E-F, at 47 days after S fertilization) mature leaves of plants receiving N fertilization. As a result, the [Mo]:[S] ratio was significantly lower (Fig. 5G-I) in the absence of N mineral fertilization in mature leaves, than in N fertilized plots with no S, therefore reflecting lower S requirements.

In the same way, plant growth was stimulated by a second N fertilization of 60 kg N ha⁻¹ (corresponding to plots with 125 kg N ha⁻¹) and the relative S content in mature leaves was reduced. For example, when comparing Fig. 5B and C, the S content in mature leaves of plants with 125 kg N ha⁻¹ was significantly lower ($P < 0.05$) than for plants with 65 kg N ha⁻¹ and for a given level of S fertilization (0, 12 or 36 kg S ha⁻¹). In contrast, the N fertilization rate had no significant effect on the Mo content of mature leaves (Fig. 5E compared to Fig. 5F). As a result, when comparing mature leaves of plants receiving 125 kg N ha⁻¹ (Fig. 5I) to 65 kg N ha⁻¹ (Fig. 5H), the [Mo]:[S] ratio

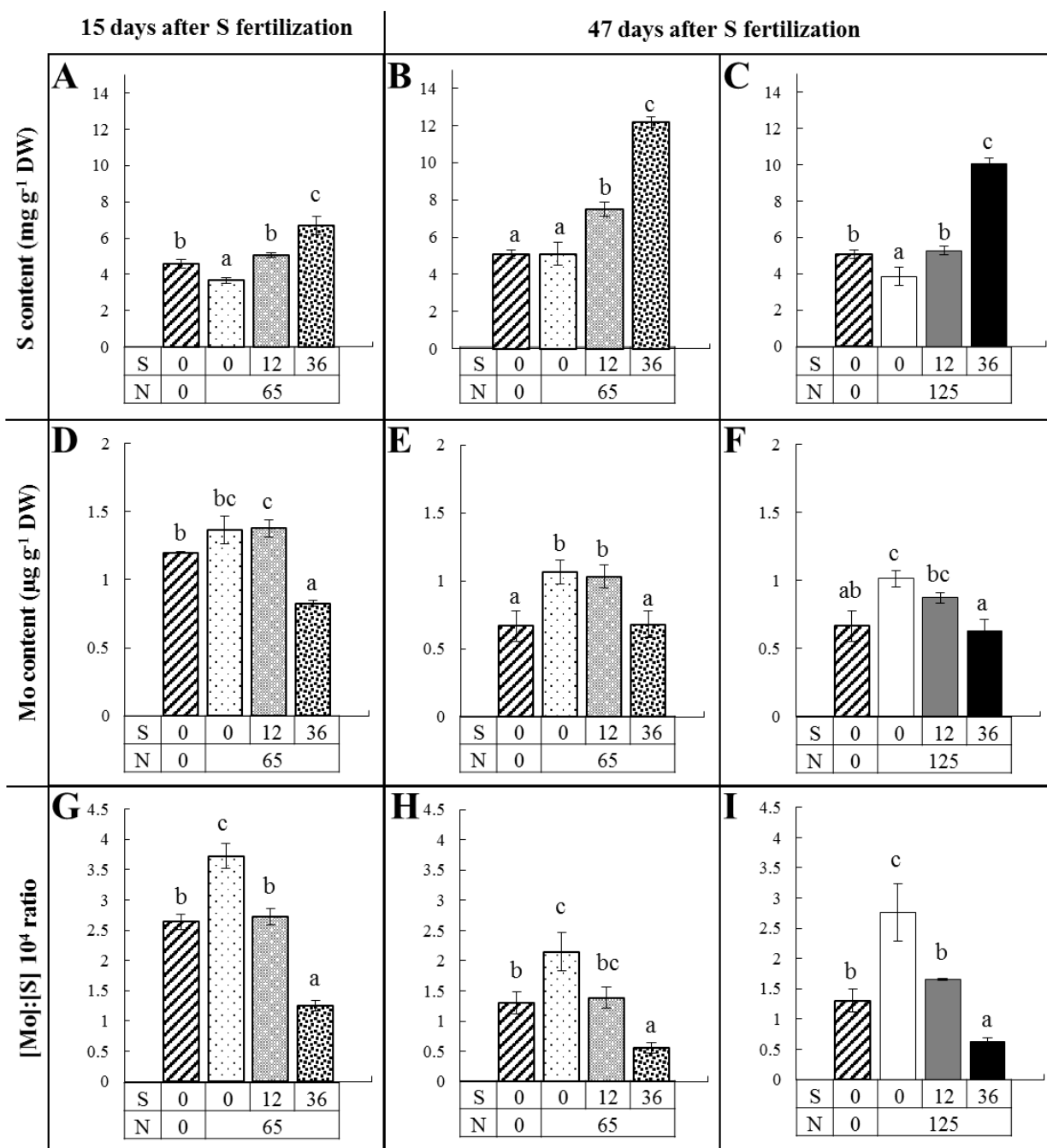


Figure 5: (A, B, C) S content (mg g⁻¹ DW), (D, E, F) Mo content (μg g⁻¹ DW) and (G, H, I) the [Mo]:[S] 10⁴ ratio (to simplify reading the [Mo]:[S] ratio is presented with a multiplier factor of 10⁴) in mature leaves of *B. napus* grown under field conditions after (A, D, G) 15 and (B, C, E, F, H, I) 47 days of fertilization. Plants received no mineral fertilization (hatched bars, 0 kg S.ha⁻¹, 0 kg N.ha⁻¹), or 0 kg S ha⁻¹ (white bar), 12 kg S ha⁻¹ (gray bar) or 36 kg S ha⁻¹ (black bar) with 65 kg N ha⁻¹ (dashed bars) or 125 kg N ha⁻¹ (full bars). Within the same graph, letters when different between fertilization treatments indicate significant differences for $P < 0.05$.

was higher in leaves of plants with a higher N fertilization, regardless of the rate of S fertilization, which also reflected the higher requirement for S of N fertilized plants.

Threshold values of the [Mo]:[S] ratio were then determined 15 days after S fertilization, corresponding to development stage in mature leaves of oilseed rape before flowering, to determine whether or not S fertilization was required. Threshold values of the [Mo]:[S] ratio were calculated as the sum or difference between the means of data presented in **Fig. 5G** and the 95% confidence intervals for S sufficient plots (36 kg S ha⁻¹, 1.63) and of S deficient plots (0 kg S ha⁻¹, 2.83), respectively. Such thresholds would allow clustering of the plots into three groups: S sufficient (ratio <1.61), at risk of S deficiency (ratio between 1.61 and 2.83) and S deficient (ratio >2.83). This classification into three groups has been tested on 45 commercial oilseed rape crops from different locations in France and for which mature leaves were harvested before flowering and S fertilization (**Fig. 6**). The use of these threshold values suggested that 18, 24 and 58% of the crops were classified as S sufficient, at risk of S deficiency and S deficient, respectively.

III.5. Test of genericity of the [Mo]:[S] ratio as S-deficiency indicator

The [Mo]:[S] ratio was calculated in leaves of other cultivated species: *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *P. sativum* and *S. lycopersicum*, grown in controlled conditions. In all species, S content was significantly reduced and Mo content was significantly increased by S deficiency (**Table 2**). For example, in *B. napus* the Mo content increased as early as 1 day after deprivation, in *T. aestivum* as early as 2 days and in *Z. mays* as early as 5 days of S deficiency, whereas the S content was reduced later. Consequently, the [Mo]:[S] ratio was highly and significantly increased by S deficiency following 1 day of treatment in *B. napus*, 2 days in *T. aestivum*, 5 days in *Z. mays* and this rise was amplified over time. For *B. oleracea*, *P. sativum* and *S. lycopersicum*, no early harvest was performed, but significant increases in leaf Mo content and in the [Mo]:[S] ratio were found after 20, 19 and 65 days, respectively. Values of the [Mo]:[S] ratio were species-dependent, with values ranging from 3 to 250 in control plants and from 27 to 5934 in S-deprived plants, as a result of a high accumulation of Mo in *B. napus*, *T. aestivum* and in *Z. mays*.

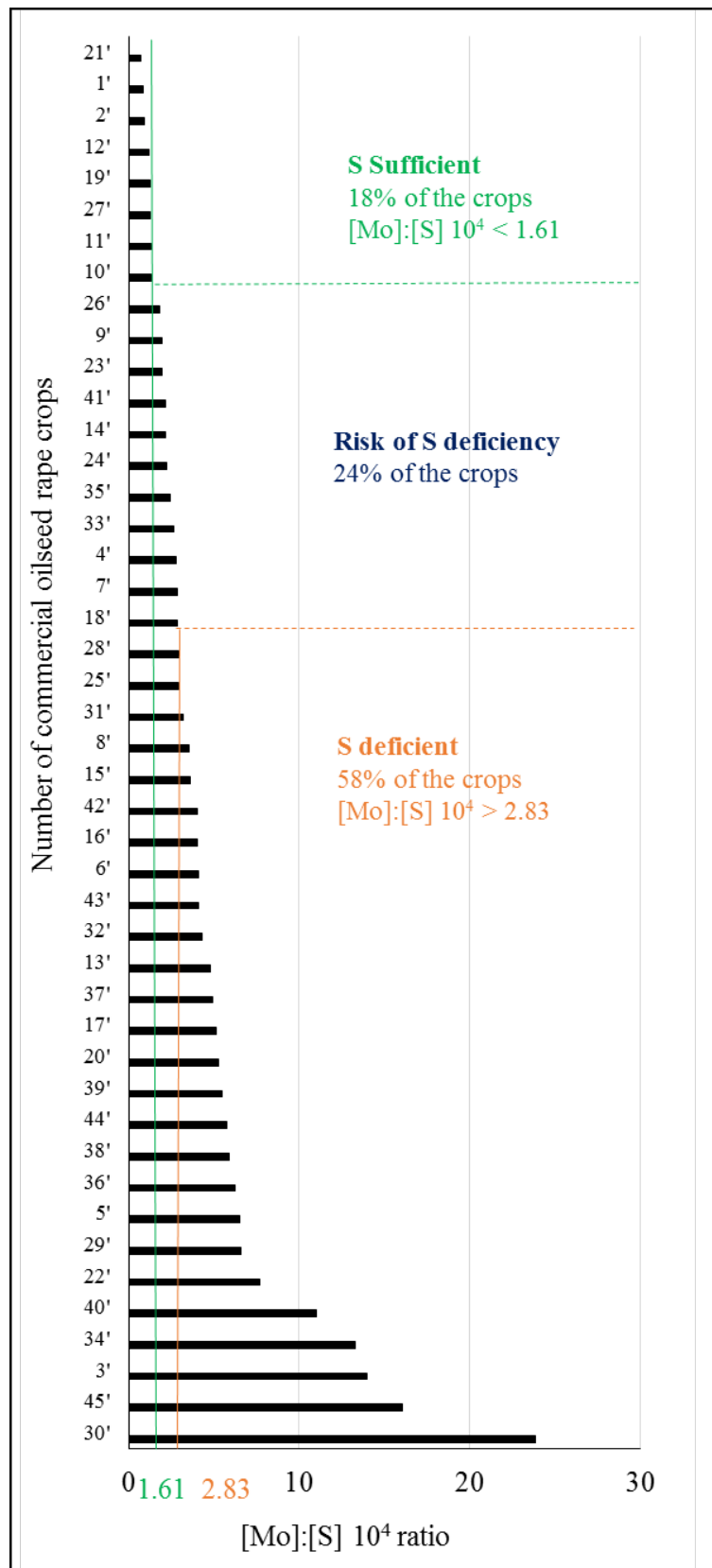


Figure 6: Classification of 45 commercial oilseed rape crops from different locations in France (see Supplemental data SD1) according to their $[Mo]:[S] 10^4$ ratio in mature leaves quantified before flowering and S fertilization. Threshold values of the $[Mo]:[S] 10^4$ ratio classified these oilseed rape crops into three S status groups: S deficient, at risk of S deficiency and S sufficient plants.

IV. Discussion

IV.1. Perturbations of Mo homeostasis by non-specific transport of molybdate and sulfate

It is usually assumed that plant nutrient contents are tightly regulated through balanced activities of membrane transporters that mediate the uptake and distribution of nutrients so that a relative compositional homeostasis is maintained. However, under deficiencies, crosstalk induces unavoidable accumulations of some nutrients that upsets the balance and modifies the ionic composition of plant tissues (Baxter *et al.*, 2008). In our study, among all mineral nutrients, only Mo uptake was strongly increased by S deficiency in *B. napus* (Fig. 2) leading to its accumulation in leaves (Fig. 3B). From the first day of S deprivation, the Mo content was dramatically increased by 128% in S-deprived plants relative to plants continuously supplied with S. This accumulation of Mo in response of S deficiency has previously been reported in *Brassicaceae* species. Schiavon *et al.* (2012) reported that S deficient *B. juncea* accumulated significantly more Mo than control plants. Conversely, the supply of S significantly decreased the uptake of Mo by *B. oleracea* (Hunashikatti *et al.*, 2000), *B. juncea* (Harris *et al.*, 2014) and by *B. napus* (Balik *et al.*, 2006).

Two root membrane molybdate transporters have been reported so far as responsible for Mo uptake in plants: MOT1 (Tomatsu *et al.*, 2007) and ASY (Hibara *et al.*, 2013). In our study, under S deprivation, the expression of *BnaMot1* and *BnaAsy* remained similar to control plants (Fig. 3D) and consequently, it may be assumed that the increase in Mo uptake was not a result of an induction of these specific Mo transporters. This is consistent with previous work reporting that root *TaeMot1* expression in *T. aestivum* was not significantly affected by S deficiency despite increased concentration of Mo in plant tissues (Shinmachi *et al.*, 2010). Indeed, the involvement of MOT1 in plant Mo uptake remains unclear as recent results established the localization of MOT1 in mitochondria (Baxter *et al.*, 2008) and not in plasma membranes and in vesicle membranes as previously proposed by Tomatsu *et al.* (2007). Alternatively, some authors have suggested that the accumulation of Mo could be due to non-specific transport by sulfate carriers (Schiavon *et al.*, 2012). Indeed, molybdate and sulfate through their similar chemical properties (charge, size, structure, bonding-properties) could compete for the same binding sites (Dudev and Lim, 2004; Bittner, 2014). In our results, others genes (*BnaSutr1.1* and *BnaSultr 1.2*) encoding high-affinity sulfate transporters of group 1 have been studied in order to clarify their ability to also transport molybdate. The increased uptake of Mo in S-deprived plants was strongly correlated with an increase in *BnaSultr1.1* expression at least during the first 7 days (Fig. 3D). Similarly, in *T. aestivum*, under S deficiency expression of genes encoding the sulfate transporters, *TaeSultr1.1* and

Table 2: Sulfur content (mg g^{-1} DW) and Mo content ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) and the [Mo]:[S] ratio in leaves of *B. napus*, *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *P. sativum* and *S. lycopersicum* following different S treatments (+S: control treatment, -S: S deficiency treatment) to plants grown under controlled conditions (given in Supplemental Data SD3). Data are given as the mean \pm SE ($n=4$ or $n=3$ for *P. sativum* data). *, ** and *** indicate significant differences between control and S-deprived plants for $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively.

Species	Days after -S treatment	S (mg g^{-1} DW)		Mo ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)		Ratio [Mo]:[S]	
		+S	-S	+S	-S	+S	-S
<i>B. napus</i>	0		10.33 \pm 0.46		154.57 \pm 10.16		149.75 \pm 7.34
	1	10.30 \pm 0.39	9.70 \pm 0.56	175.35 \pm 6.87	237.01 \pm 7.70 ***	170.23 \pm 1.12	247.40 \pm 18.67 **
	21	15.25 \pm 0.39	2.33 \pm 0.14 ***	308.49 \pm 14.02	617.82 \pm 40.08 ***	202.21 \pm 6.52	2660.38 \pm 91.28 ***
<i>B. oleracea</i>	20	4.83 \pm 0.46	1.90 \pm 0.04 ***	4.02 \pm 0.21	5.03 \pm 0.16 **	8.44 \pm 0.49	26.53 \pm 1.16 ***
<i>T. aestivum</i>	2	3.60 \pm 0.18	3.45 \pm 0.22	90.17 \pm 9.43	201.48 \pm 7.72 ***	249.52 \pm 18.17	584.45 \pm 24.95 ***
	8	3.47 \pm 0.06	3.12 \pm 0.00 **	85.14 \pm 1.23	719.90 \pm 36.62 ***	245.32 \pm 5.56	2306.22 \pm 110.52 ***
	24	3.37 \pm 0.02	1.85 \pm 0.05 ***	79.83 \pm 2.08	977.11 \pm 32.63 ***	236.67 \pm 5.58	5285.33 \pm 236.13 ***
<i>Z. mays</i>	0		2.82 \pm 0.10		22.62 \pm 0.85		80.18 \pm 1.54
	5	3.05 \pm 0.03	2.11 \pm 0.13 ***	24.67 \pm 0.48	468.16 \pm 28.15 ***	80.86 \pm 0.82	2224.10 \pm 72.16 ***
	18	2.39 \pm 0.05	0.95 \pm 0.04 ***	27.95 \pm 1.65	562.63 \pm 34.46 ***	116.67 \pm 5.06	5934.41 \pm 137.28 ***
<i>P. sativum</i>	0		2.75 \pm 0.09		20.48 \pm 4.22		73.76 \pm 12.95
	19	2.73 \pm 0.10	2.20 \pm 0.14 *	9.43 \pm 0.50	12.46 \pm 0.34 **	34.49 \pm 0.67	57.63 \pm 5.58 **
<i>S. lycopersicum</i>	65	10.10 \pm 0.71	1.83 \pm 0.27 ***	2.86 \pm 0.03	5.09 \pm 0.82 *	2.88 \pm 0.21	27.90 \pm 1.96 ***

TaeSultr4.1, increased and coincided with a 3.7 fold increase in Mo contents in grain (Shinmachi *et al.*, 2010). Regardless of the correlation between Mo uptake and the expression of *BnaSultr1.1* (Fig. 3D), to determine the role of *Sultr1.1* and *Sultr1.2* in the uptake of Mo a collaborative experiment using *Atsultr1.1* and *Atsultr1.2* mutants is under progress (Stanislav Kopriva, Botanical Institute and Cluster of Excellence in Plant Science, University of Cologne). Pending the data from this experiment, data available on the Purdue ionomics information management system (See Baxter *et al.*, 2007 and <http://www.ionomicshub.org/arabidopsis/piims/showIndex.action>) have been selected for *Atsultr1.1* and *Atsultr1.2* mutants (Table 3). The double KO of *Atsultr1.1* and *Atsultr1.2* transcription led to a decrease in the S and Mo content (Table 3), suggesting that these two transporters could be involved in the uptake of S and Mo. Moreover, the content of Mo in the *Atsultr1.1* mutant was reduced. In the *Atsultr1.2* mutant the content of S was increased suggesting that the expression of the *AtSultr1.1* gene was upregulated to maintain the uptake of S, which could lead to an increase in Mo uptake, as suggested by the increase in Mo content in leaves. Therefore, the overall results suggest that a very early increase in Mo uptake following S deprivation is a direct consequence of the strong and early increased expression of *Sultr1.1* encoding a root sulfate transporter.

IV.2. A potential indicator derived from early molecular events

Under field conditions, the Mo and S contents also changed in opposite ways in leaves of plants submitted to different S fertilization rates. The lowest Mo contents were found in leaves of plants with the highest S fertilization that had the highest S content. Reciprocally, the highest Mo and lowest S contents were found in leaves of plants supplied with the lowest S fertilizations (Fig. 5 A-F and Supplemental data SD4 A-F). Similar low Mo content in leaves in S fertilized plants and a range of leaf concentrations (*i.e.* between 1 and 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) have been previously reported by Balik *et al.* (2006) in oilseed rape plants and by Hunashikatti *et al.* (2000) in cabbage under field conditions. However, the leaf Mo contents obtained in our field experiment were lower than those found under hydroponic conditions. This can easily be explained by the fact that the Mo concentration in the nutrient solution was far higher than in the soil solution, nevertheless, the trend of Mo accumulation during S deficiency was similar. Because of the opposing variations in leaf S and Mo contents, the [Mo]:[S] ratio was lower in plants with an optimal S fertilization than in plants with reduced S fertilization (Fig. 5 G-I and Supplemental data SD4 G-I). In our study, the [Mo]:[S] ratio therefore discriminated different rates of S fertilization and revealed the S status of plants.

Table 3 (provisional): Data extracted from the Purdue ionomics information management system related to S and Mo contents in lines (Line median in $\mu\text{g g}^{-1}$) of the *Arabidopsis* single mutant KO, *Atsultr1.1* or *Atsultr1.2*, and of the *Arabidopsis* double mutant KO, *Atsultr1.1-1.2*, and in wild type (Background median in $\mu\text{g g}^{-1}$). Median percentage change was the difference between the content in mutant and wild type. *P* values are given for $n > 4$. Sulfur and Mo contents were estimated from ^{34}S and from ^{95}Mo (in *Atsultr1.1*) or as ^{98}Mo (in other mutants), respectively.

		<i>Atsultr1.1-1.2</i> DKO Tray 2042 - Pot d sultr1;1 1;2 DKO	<i>Atsultr1.1</i> KO Tray 399 - Pot b SALK_093256_homo	<i>Atsultr1.2</i> KO Tray 2042 - Pot h 78730 single mutant (-++)
S	Line Med ($\mu\text{g g}^{-1}$)	5340	N/A	8063
	Background Med ($\mu\text{g g}^{-1}$)	6527	N/A	6527
	% Difference Med	-18.18	N/A	23.53
	<i>P</i> value	0.02360	N/A	0.01280
Mo	Line Med ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.6395	6.029	1.721
	Background Med ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1.188	7.227	1.188
	% Difference Med	-46.15	-16.58	44.92
	<i>P</i> value	0.000E-1	0.000E-1	0.07670

It was also found that the increase in plant growth rates that were triggered by N fertilization increased plant S requirements, resulting in a decrease in the S content in oilseed rape leaves under field conditions (**Fig. 5 A-C and Supplemental data SD4 A-C**) as previously reported (Zhao *et al.*, 1993). A second N fertilization (60 kg ha⁻¹) had no major impact on the Mo content of leaves, while the leaf Mo content was lower in N unfertilized plants (**Fig. 5E** compared to **Fig. 5F and Supplemental data SD4 E-F**). This lower Mo accumulation found in unfertilized plants could be explained by a reduced growth rate and thus by lower S requirements. As a consequence, N fertilization could interfere in the evolution of the [Mo]:[S] ratio. Indeed, a supplementary N fertilization increased the [Mo]:[S] ratio and the total lack of N fertilization decreased the [Mo]:[S] ratio (**Fig. 5 H-I and Supplemental data SD4 H-I**). Nevertheless, this ratio still allowed differentiation of the plots with different rates of S fertilization.

To allow the effective use of the [Mo]:[S] ratio under field conditions, threshold values are required to estimate the S status of oilseed rape crops, and a first estimation has been calculated from a field experiment using different levels of S fertilization. According to these threshold values, three S status groups were defined: S deficient, at risk of S deficiency and S sufficient, with the additional intermediate class taking into account the area of uncertainty. The study of 45 commercial oilseed rape crops in France suggested that more than 50% were potentially S deficient (**Fig. 6**), highlighting the need for optimizing S fertilization practices. However, more accurate determination of [Mo]:[S] ratio threshold values would require a larger set of experiments during which S fertilization would need to be modulated and the effects on seed yield and quality monitored.

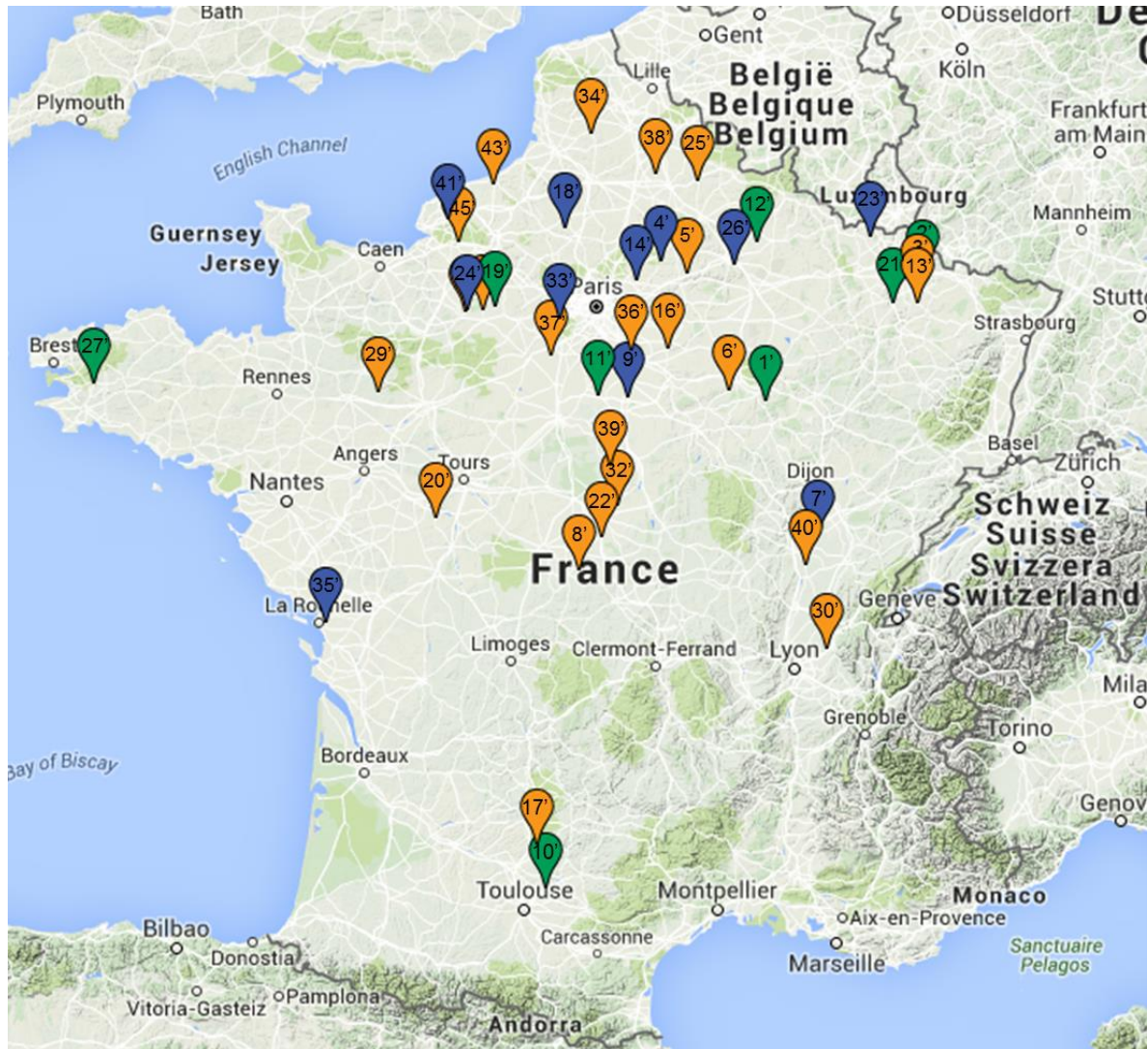
Because oilseed rape is well known for its high S requirements, other cultivated species such as *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *P. sativum* and *S. lycopersicum* have been tested (**Table 2**) for their response to S deficiency. In all of them, the leaf [Mo]:[S] ratio was significantly increased by reduced S availability, as a result of a decrease in leaf S content coupled with an accumulation of Mo. The general response pattern can also be supported by results from the literature with the same or different species, for example, globe amaranth (*Gomphrena globosa*) (Wang *et al.*, 2010), cabbage (Hunashikatti *et al.*, 2000), wheat (Shinmachi *et al.*, 2010) and tomato (Alhendawi *et al.*, 2005). A increase in the [Mo]:[S] ratio resulting from an inadequate S supply seems to be a general response of higher plants, whatever their intrinsic requirements for S.

Overall, the analysis of the leaf [Mo]:[S] ratio is a practical alternative to detect early S deficiency under field conditions, given that molecular indicators require laboratory analysis and use of control plants, which are not easily performed under field conditions. Alternatively, new

breakthrough technologies using X ray fluorescence or laser metal analysis, also available as portable field tools, would allow an easy quantification of the [Mo]:[S] ratio.

Acknowledgements

The authors thank M. Chédeville for providing the experimental site at Ondefontaine and for technical help to fertilize plots, and all farmers identified by DATAGRI who collaborated in this study. Acknowledgements go to Vegenov for their participation in the multispecies experiment. The authors acknowledge the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for the element analysis used in this study and also appreciate the technical help of Marie-Paule Bataillé, Frédérine Marie and Josette Bonnefoy. The authors are grateful for the technical help of Julie Levallois for molecular analysis. The authors thank Dr Laurence Cantrill for improving the English in the manuscript. This work, conducted through the SERAPIS project, was supported by the Regional Council of Lower Normandy (grant number 12P03057), the Regional Council of Brittany (grant number 12008011), the European Regional Development Fund (grant number 33525) and the Centre Mondial d'Innovation – Groupe Roullier.



Supplemental data SD2: Location of 45 commercial crops in France with crops classified into three S status groups: S deficient in orange, at risk of S deficiency in blue and S sufficient in green.

Supplemental data

Supplemental data SD1: Composition of the two nutrient solutions used for control and S deprivation during the treatment period of *B. napus* and *Z. mays*. Nutrient concentrations are expressed in mM.

Nutrients	Control (+S)	S deprivation (-S)
KNO ₃	3.75	3.75
KH ₂ PO ₄	0.25	0.25
EDTA, 2NaFe	0.20	0.20
MgSO ₄	0.50	0
CaCl ₂	0.50	0
MgCl ₂	0	0.50
CaCO ₃	0.91	1.41
H ₃ BO ₃	1.4 x 10 ⁻²	1.4 x 10 ⁻²
MnSO ₄	5 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³
ZnSO ₄	3 x 10 ⁻³	3 x 10 ⁻³
CuSO ₄	7 x 10 ⁻⁴	7 x 10 ⁻⁴
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	7 x 10 ⁻⁴	7 x 10 ⁻⁴
CoCl ₂	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴
NiCl ₂	4 x 10 ⁻⁵	4 x 10 ⁻⁵

Supplemental data SD3: Growth conditions used for multispecies experiment.

Z. mays

Seeds of *Z. mays* cv Ronaldinio were germinated on perlite over demineralized water for seven days in the dark and then five days under natural light. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to hydroponic conditions (18 seedlings per 20L-plastic tank) in a greenhouse, between March and April, with a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night). Natural light was supplemented with high-pressure sodium lamps (Master Greenpower T400W, Philips, Amsterdam, Netherlands) (350 μmol m⁻² s⁻¹ of photosynthetically active radiation at the canopy height) for 16h. The aerated nutrient solution contained: 3.75 mM KNO₃, 0.5 mM MgSO₄, 0.5 mM CaCl₂, 0.25 mM KH₂PO₄, 0.2 mM EDTA-2NaFe, 14 μM H₃BO₃, 5 μM MnSO₄, 3 μM ZnSO₄, 0.7 μM CuSO₄, 0.7 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.1 μM CoCl₂, 0.04 μM NiCl₂ and was buffered to pH 6.6 with 0.91 mM CaCO₃. This solution was renewed according to the rate of NO₃⁻ depletion monitored daily by using NO₃⁻ test strips (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) in order to maintain optimal nutrition conditions. After 8 days of growth, plants were separated into two batches supplied with a modified nutrient solution chosen in order to achieve S deficiency and to maintain the same concentration of other nutrients (**Supplemental data SD1**): (i) control plants (control) were grown

with $508.7 \mu\text{M SO}_4^{2-}$, (ii) S limited plants (-S) were grown with $8.7 \mu\text{M SO}_4^{2-}$. Nutrient solutions were also renewed according to NO_3^- depletion by monitoring the NO_3^- level in the tank.

T. aestivum

Seeds of *T. aestivum* L. cv Sankara were germinated on perlite over demineralized water for five days in the dark and then five days under light. Seedlings were transferred to hydroponic conditions (30 seedlings per 7L-plastic tank) in a growth chamber, with a thermoperiod of 22°C (day) and 18°C (night). Plants received artificial light provided by neon lamps (Lumilux cool daylight, 36W, Osram, Munich, Germany) ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation at the canopy height) for 12h. The aerated nutrient solution contained: 2 mM KNO_3 , 1 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.5 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA-2NaFe, 23 $\mu\text{M H}_3\text{BO}_3$, 5 $\mu\text{M MnSO}_4$, 2 $\mu\text{M ZnSO}_4$, 0.9 $\mu\text{M CuSO}_4$, 0.3 $\mu\text{M} (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.1 $\mu\text{M CoCl}_2$ and was buffered to pH 6 with KOH. This solution was renewed every two or three days. After 11 days of growth, plants were separated into two batches: (i) control plants were grown with $507.9 \mu\text{M SO}_4^{2-}$, (ii) S limited plants were grown with $7.9 \mu\text{M SO}_4^{2-}$, replacing MgSO_4 by MgCl_2 .

B. oleracea

B. oleracea cv Nikolas plants were grown individually in pots filled with a mixture of perlite: vermiculite (v:v, 1:1) in 1L pots for one month then in 2L pots. Plants were grown in a growth chamber, with temperatures of 21°C during the day and 18°C during the night, a 14h photoperiod and a mean photosynthetically active radiation of $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was guaranteed by the use of neon lamps (Lumilux soft white, L58W/840, Osram, Munich, Germany). Plants were watered throughout the experiment, every two days with a nutrient solution composed of 4.5 mM KNO_3 , 3.6 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.4 NH_4NO_3 , 0.3 mM MgSO_4 , 0.1 mM MgCl_2 , 1 mM KH_2PO_4 , 35 mg l^{-1} Fe-EDTA (FerVeg E13, Angibaud et spécialité, La Rochelle, France) and 3.5 mg l^{-1} OligoMix (Oligoveg S2, Angibaud et spécialité, La Rochelle, France). For S deficiency treatment the same solution described above was used except that MgSO_4 was removed and MgCl_2 was adjusted to 0.5 mM.

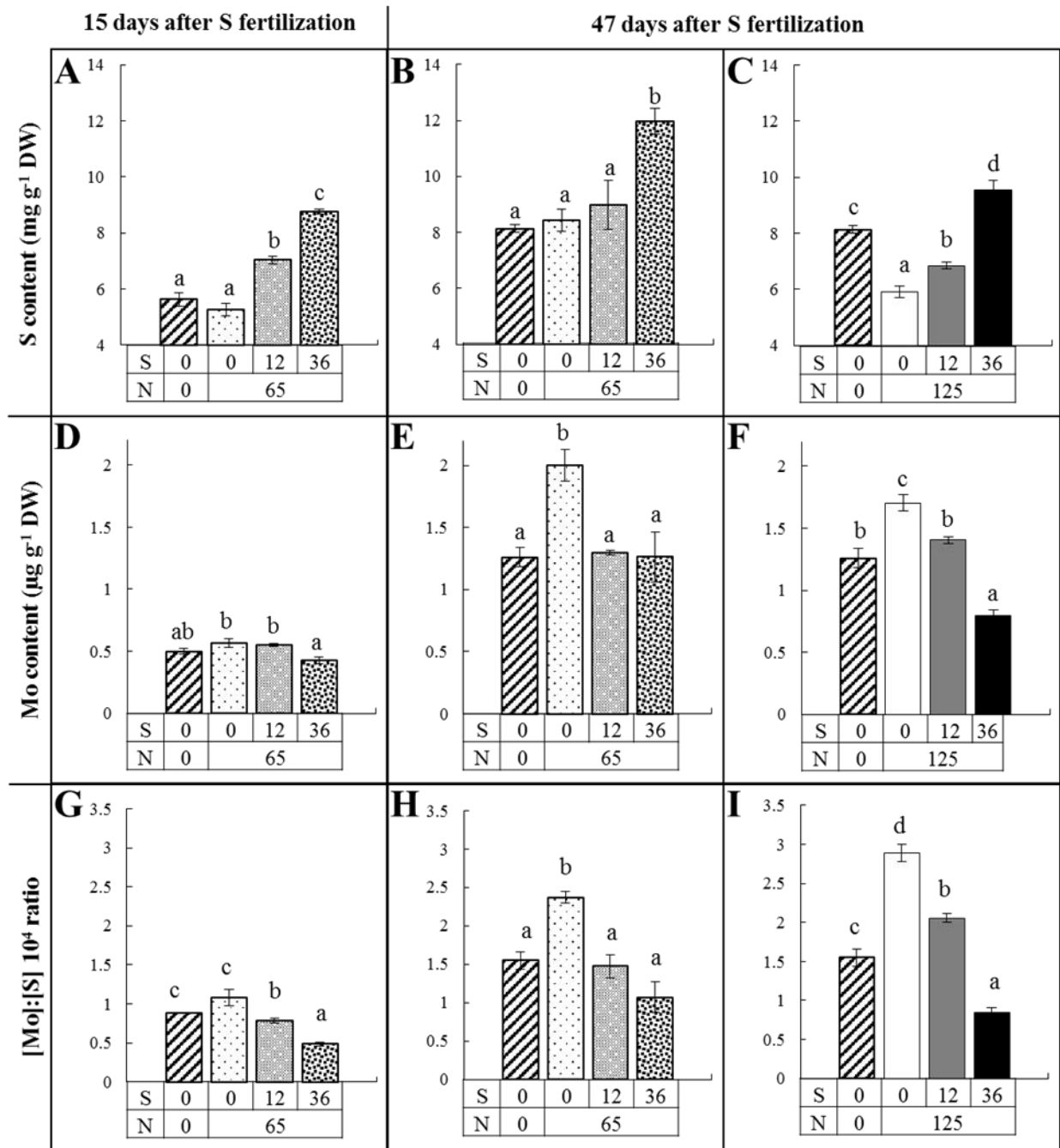
S. lycopersicum

S. lycopersicum cv Plaisance on Emperador was grown in a greenhouse between April and July under natural light temperatures controlled to 20°C during the day and 15°C during the night. One plant per 1L pot was cultivated for one month and transferred to 3L pots filled with a mixture of perlite: vermiculite (v:v, 1:1) and were watered every day by a nutrient solution containing: 5.2 mM

KNO_3 , 6.2 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.5 NH_4NO_3 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 1.9 mM MgSO_4 , 0.3 mM MgCl_2 , 15 mg l^{-1} Fe-EDTA (FerVeg E13, Angibaud et spécialité, La Rochelle, France) and 3.5 mg l^{-1} OligoMix (Oligoveg S2, Angibaud et spécialité, La Rochelle, France). For S deficiency treatment the same solution described above was used except that MgSO_4 was removed and MgCl_2 was adjusted to 2.2 mM.

P. sativum

P. sativum L. plants (genotype Cameor) were grown in a randomized complete-block design in a greenhouse temperature controlled to 19°C during the day and 15°C during the night. Artificial lighting was used to reach 16h light per day: 400 W sodium lamps, 6 lamps in 17.32 m², radiation in the range 400-700 nm, and photosynthetic characteristics of 695 $\mu\text{mol s}^{-1}$. Pea seeds were directly sown at 2 cm depth in 2L pots containing 25% sand (type B3, Biot, France) and 75% perlite. Three mature seeds were sown per pot, then after emergence, only one seedling was kept in each pot. Control plants were supplied with a nutrient solution containing 4 mM KNO_3 , 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.3 mM MgSO_4 , 0.9 mM MgCl_2 , 0.2 mM NaCl , 0.72 μM Na_2MoO_4 , 0.10 mM FeNa-EDTA, 8.2 μM MnCl_2 , 1 μM CuCl_2 , 1 μM ZnCl_2 , 30 μM H_3BO_3 , 1 mM K_2HPO_4 (pH adjusted to 6.3 using H_3PO_4 before addition of K_2HPO_4). An automatic plant watering system, with two drippers per pot, was used for all plants. For applying S deficiency (at the eight-leaf stage), the pots were rinsed with 4x2L of deionized water and SO_4^{2-} from the solution described above was replaced by 1.16 mM MgCl_2 .



Supplemental data SD4: (A, B, C) S content (mg g⁻¹ DW), (D, E, F) Mo content (µg g⁻¹ DW) and (G, H, I) the [Mo]:[S] 10⁴ ratio (to simplify reading the [Mo]:[S] ratio is presented with a multiplier factor of 10⁴) in young leaves of *B. napus* grown under field conditions after (A, D, G) 15 and (B, C, E, F, H, I) 47 days of fertilization. Plants received no mineral fertilization (hatched bars, 0 kg S ha⁻¹, 0 kg N ha⁻¹), or 0 kg S ha⁻¹ (white bar), 12 kg S ha⁻¹ (grey bar) or 36 kg S ha⁻¹ (black bar) with 65 kg N ha⁻¹ (dashed bars) or 125 kg N ha⁻¹ (full bars). Within the same graph, letters when different between fertilization treatments indicate significant differences for $P < 0.05$.

Chapitre VI

Discussion générale et perspectives



Tableau VI.1 Récapitulatif des avantages et des inconvénients concernant l'utilisation des indicateurs de la nutrition soufrée proposés dans la littérature.

	Indicateurs	Auteurs ayant proposé l'indicateur	Avantages	Inconvénients
Indicateurs Grilles, modèles ou sol	Grilles de décision ou d'évaluation	Arvalis et COMIFER	Tient compte de multiples facteurs : sol, pluviométrie, précédent cultural...	Indique une carence potentielle selon l'environnement de la culture et non pas selon les besoins réels de la plante
	Modélisation	McGrath et Zhao, 1995	Prédit les risques de déficiences en S au Royaume-Uni	- Trop large échelle, ne permet pas de pronostic parcellaire
	Analyses de sol	- Scherer, 2001 - Scherer, 2009 - Méthode Scott	Prend en compte le S du sol potentiellement disponible pour la culture	Résultats imprécis trop de variabilité et d'interférences extérieures
Indicateurs plantes macroscopiques	Diagnostic visuel	Schnug et Haneklaus, 1998	Détecte les carences sévères en S	- Trop tardif - Problème de spécificité
	OAD optiques	- Fluorimétrie (SADEF-Laco) - Réflectométrie - GPN soufre (Société grande paroisse)	- Pratique, utilisable au champ - Détecte une limitation en S potentiellement avant l'apparition des symptômes	- Problème de spécificité - Non adapté à la culture de colza en plein champ
Indicateurs plantes biochimiques	SO ₄ ²⁻ ou Stotal (OAD Nutricheck)	- Randall <i>et al.</i> , 1981 - Scaife et Burns, 1986 - Pinkerton, 1998 - Société Challenge Agriculture	- Réponse ample - Une seule mesure analytique - SO ₄ ²⁻ plus sensible que Stotal - SO ₄ ²⁻ facilement mesurable au champ par l'OAD Nutricheck	- Varie au cours du développement sans chronologie cohérente - Echantillonnage précis (organe et stade de développement) - Problème de spécificité - Références du Nutricheck non validé sur colza au champ
	Molécules organiques : glutathion ou amides	- Zhao <i>et al.</i> , 1996 - Blake-Kalff <i>et al.</i> , 1998 et 2000b	Réponse précoce	- Au champ teneurs en glutathion peu variables - Problème de spécificité
	Expression des gènes	Howarth <i>et al.</i> , 2009	Réponse précoce et ample	- Analyses moléculaires au champ peu envisageables en routine
	Ratio N:S	Rasmussen <i>et al.</i> , 1977	Varie peu au cours du développement	- Echantillonnage précis (organe et stade de développement) - Erreur diagnostic possible selon fertilisation N
	Ratio SO ₄ ²⁻ :Stotal ou HI-S:Stot	- Spencer et Freney, 1980 - Jones <i>et al.</i> , 1980	Peu d'effet de l'âge de la plante	- Deux paramètres non indépendants - Nécessite deux méthodes analytiques
	Ratio malate:sulfate	- Blake-Kalff <i>et al.</i> , 2000a,b et 2004	- Varie très peu pendant le développement de la plante - Même valeur seuil tout au long de la culture - Nécessite une seule méthode analytique - Indépendant du type de sol et des espèces - Impact faible de la fertilisation N	- Mise en évidence sur sol à forte probabilité de réponse à la fertilisation S - Valeurs seuils à réévaluer

Chapitre VI

Discussion générale et perspectives

I. Discussion générale

De par ses rôles physiologiques variés et essentiels, le S est un élément indispensable au bon développement des plantes et à celui du colza, culture très exigeante pour cet élément. Dans le contexte actuel, les rejets atmosphériques soufrés, ayant considérablement chuté au cours des dernières décennies, ne suffisent plus à compenser au moins partiellement les exportations de S par le colza. L'oligotrophisation des sols en S qui en résulte peut avoir des conséquences non négligeables sur le rendement et la qualité des produits récoltés. Les agriculteurs sont donc amenés à amender leurs cultures à l'aide de fertilisants soufrés selon des préconisations générales, pas toujours adaptées aux besoins réels de la culture, ou plus rarement, à l'aide d'indicateurs pas toujours fiables ou simples à utiliser en conditions de plein champ. En effet, les indicateurs proposés dans la littérature ne sont pas toujours optimaux pour diagnostiquer le statut soufré de la plante, comme le montre le **Tableau VI.1** résumant les avantages et inconvénients des différents indicateurs actuellement disponibles. Dans ce contexte, il apparaissait donc essentiel d'identifier et de développer de nouveaux indicateurs de la nutrition soufrée du colza permettant de diagnostiquer de façon précoce, fiable et spécifique l'état de cette dernière afin de pouvoir gérer au mieux la fertilisation soufrée par rapport aux besoins réels des cultures. Ainsi, l'objectif général de cette thèse consistait à : i) étudier la cinétique précise de réponse du colza à une privation en S en conditions contrôlées afin d'en dégager des indicateurs reposant sur des mécanismes physiologiques précoces et pouvant permettre de diagnostiquer le statut soufré de cette culture, ii) valider les indicateurs précédemment mis en évidence en condition de plein champ et développer une méthode simple d'analyse et d'interprétation pouvant, à terme, conduire au développement d'un Outil d'Aide à la Décision (OAD) et iii) valider la généricité de ces indicateurs sur un plus large panel d'espèces. Finalement, certains éléments du **Tableau VI.1** seront repris tout au long de cette discussion afin d'apporter des éléments de comparaison entre les indicateurs mis en évidence lors de nos travaux et ceux déjà proposés dans la littérature.

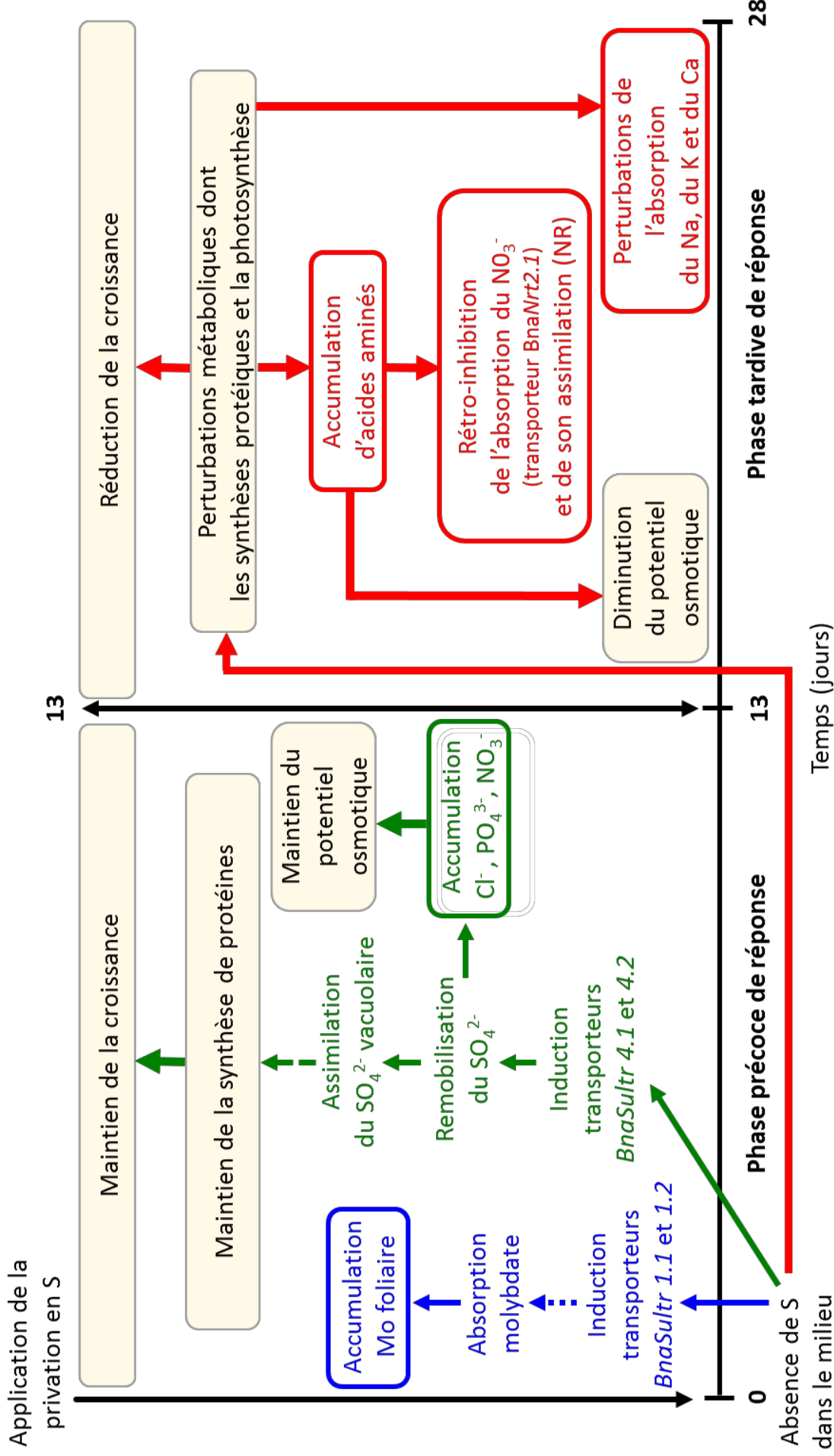


Figure VI.1 Résumé schématique de la cinétique des réponses physiologiques du colza à une privation en S en conditions contrôlées. En bleu sont représentés les mécanismes impliqués dans l'accumulation de Mo, en vert ceux impliqués dans l'accumulation d'anions tels que Cl^- , PO_4^{3-} et NO_3^- , lors de la remobilisation du SO_4^{2-} vacuolaire et en rouge sont représentées les perturbations métaboliques intervenant tardivement en réponse à une privation en S.

I.1. L'étude cinétique de la réponse du colza à une privation en soufre permet de proposer deux nouveaux indicateurs indépendants et complémentaires de la nutrition soufrée

L'étude cinétique d'une réponse à une privation en S du colza, cultivé au stade rosette en conditions contrôlées (hydroponie), a permis de révéler deux périodes de réponse. La première phase dite « précoce » et intervenant durant les 13 premiers jours de privation en S, est sans effet sur la croissance de la plante. La seconde phase, dite « tardive », se traduit par une réduction de croissance, celle des parties aériennes atteignant -40 % après 28 jours de privation en S, associée à des perturbations métaboliques, les principales concernant le métabolisme azoté (**Figure VI.1**). Au-delà de 13 jours de privation, nous avons pu observer **une diminution de l'absorption** (**Figure 7A, Chap. III**) **et de l'assimilation du nitrate** se traduisant notamment par une réduction de l'expression de certains gènes codant des transporteurs de nitrate (*BnaNrt2.1*, (**Figure 8B, Chap. III**)), de l'activité nitrate réductase (**Figure 7B, Chap. III**) et une accumulation de nitrate (**Figure 3D, Chap. III**) et d'acides aminés non soufrés (**Figure 5A, Chap. III**). Cette accumulation d'acides aminés non soufrés pourrait exercer un rétrocontrôle négatif sur l'absorption du nitrate et son assimilation, en particulier sur l'activité nitrate réductase (Campbell, 1999 ; Miller *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2009 ; Nacry *et al.*, 2013) et ainsi expliquer l'accumulation de nitrate qui se produit en réponse à une privation en S. Les accumulations d'acides aminés et de nitrate pourraient également expliquer en grande partie la diminution importante du potentiel osmotique foliaire (diminution maximum de 34 % après 28 jours de traitement) qui intervient tardivement en réponse à la privation en S. Enfin, **outre les perturbations du métabolisme azoté** intervenant au-delà de 13 jours de privation, nous avons pu observer une baisse significative des teneurs foliaires en Na⁺ (**Figure 4A, Chap. III**) et K⁺ (**Figure 4B, Chap. III**) (résultant probablement de la sous expression de transporteurs racinaires aspécifiques tels que HKT1 par exemple, Schachtman et Liu, 1999), en Ca²⁺ (**Figure 4D, Chap. III**) et en sucres solubles (**Figure 5C, Chap. III**), cette dernière traduisant probablement une réduction de l'activité photosynthétique. Un autre cation, le Mg²⁺ (**Figure 4C et Figure 6, Chap. III**) est quant à lui accumulé dans les feuilles lors d'une privation en S, ce qui pourrait être lié à l'une des nombreuses interactions existantes entre cations bivalents (une limitation en Ca²⁺ augmente l'absorption de Mg²⁺, notamment) telles que décrites par Maillard *et al.* (Soumission en cours, communication personnelle). De façon plus surprenante, nous n'avons pas mis en évidence de modifications significatives, même tardives, de la teneur en acides organiques des feuilles (**Figure 5B, Chap. III**) ni même de malate, acide organique majoritaire, (analyses métaboliques non présentées dans ce document), pourtant utilisé au sein de l'indicateur malate:sulfate (**Tableau VI.1**) proposé par Blake-Kalff *et al.* (2000a).

Afin de mettre en évidence de nouveaux indicateurs précoces de la nutrition soufrée, il paraissait peu pertinent de se focaliser sur les mécanismes impliqués lors de cette phase de réponse tardive à une limitation en S durant laquelle la diminution de croissance est déjà importante et les symptômes de carence bien visibles.

Nous avons donc cherché à mettre en évidence des mécanismes de réponse précoce à la limitation en S correspondant aux 13 premiers jours de traitement pendant lesquels la croissance de l'ensemble des parties aériennes est maintenue (Figure VI.1). En réponse à une privation de S, la remobilisation des réserves soufrées, stockées majoritairement sous forme de sulfate vacuolaire, repose notamment sur l'induction de l'expression des gènes codant les transporteurs tonoplastiques de sulfate (*BnaSultr4.1* et *BnaSultr4.2*, Figure 8A, Chap. III), significative dès le 2^{ème} jour de privation, mécanisme déjà largement décrit dans la littérature (Kataoka *et al.*, 2004b ; Dubouset *et al.*, 2009 ; Abdallah *et al.*, 2010). La remobilisation du sulfate vacuolaire se traduit dès le 3^{ème} jour de privation par une réduction significative des teneurs en SO_4^{2-} des feuilles présentes avant l'application de la privation (*i.e.* Emerged leaves) (Figure 3A, Chap. III) mais aussi par les teneurs très faibles (<0,5 mg.g⁻¹ de matière sèche) des feuilles nouvellement émergées durant la privation en S (*i.e.* New emerging leaves) (Figure 3A, Chap. III). Il faut noter que ces faibles teneurs en SO_4^{2-} ont également été observées, avec les mêmes ordres de grandeur, en conditions de plein champ dans les feuilles de plantes issues de parcelles non fertilisées en S (Figure 1a-c, Chap. IV).

En dépit de cette diminution des teneurs foliaires en sulfate, il a été constaté que le potentiel osmotique restait stable et similaire aux plantes témoins durant la phase précoce de réponse à une privation en S en conditions hydroponiques (Figure 2A, Chap. III). Ce résultat est en cohérence avec une étude récente conduite par Lee *et al.* (2013) montrant que chez le colza, le potentiel osmotique des feuilles diminue significativement au-delà de 9 jours de déficience en S. **Ce maintien du potentiel osmotique peut s'expliquer par l'accumulation de composés osmotiquement actifs dans les feuilles tels que le NO_3^- , le PO_4^{3-} et le Cl^-** (Figures 3 et 6, Chap. III). Ce mécanisme de compensation osmotique a été confirmé lors l'étude comparative entre la privation en S et en Cl, en considérant que le Cl est peu métabolisé dans la plante et donc exerce un rôle essentiellement osmotique (Xu *et al.*, 2000 ; Broadley *et al.*, 2012). En effet, la privation en Cl appliquée n'a pas eu d'impact physiologique significatif (croissance identique au témoin) et le potentiel osmotique a été maintenu (Figure 2A, Chap. III) *via* une compensation de la diminution de la teneur foliaire en Cl⁻ par une accumulation d'autres composés tels que le NO_3^- , le PO_4^{3-} et les acides organiques (Figure 6, Chap. III). Les mécanismes de compensation osmotique de la remobilisation du sulfate par d'autres anions ont également été validés chez d'autres espèces en conditions contrôlées (maïs, blé, tomate, chou-fleur et *Medicago truncatula* (Tableau 1, Chap. IV)). Ils ont été validés en conditions de plein champ pour la culture du colza.

En effet, lors de l'expérimentation conduite en plein champ sur colza, l'ensemble de ces anions ($\text{Cl}^- + \text{NO}_3^- + \text{PO}_4^{3-}$) est accumulé dans les feuilles de plantes qui n'ont pas reçu de fertilisation S (Figure 1d-f, Chap. IV). De plus, nous avons pu constater que tous ces ions (SO_4^{2-} , Cl^- , PO_4^{3-} , excepté le NO_3^-) sont accumulés avec globalement les mêmes ordres de grandeur en conditions de plein champ et en hydroponie. Seul le nitrate est accumulé à un niveau beaucoup plus faible dans les feuilles en conditions de plein champ (entre 0,1 et 5 mg.g^{-1} de matière sèche) comparé à l'hydroponie (40-70 mg.g^{-1} de matière sèche) pour laquelle la nutrition azotée est maintenue constamment optimale. Ces faibles concentrations foliaires en nitrate avaient déjà été relevées lors d'autres études menées sur colza en conditions de plein champ (Blake-Kalff *et al.*, 2000a ; Sarda *et al.*, 2014). L'un des résultats à priori surprenant de ces études concerne les teneurs en Cl assez élevées dans les tissus de plantes cultivées en hydroponie et issues du champ. Le Cl⁻ et sa contribution significative au potentiel osmotique, proche quantitativement de celle du SO_4^{2-} (Figure 6A, Chap. III), comme l'illustrent les données obtenues sur parcelles expérimentales et dans le cadre du réseau de parcelles agricoles (Figure 2, Chap. IV), prend donc une importance que nous n'avions pas soupçonnée initialement.

Nous avons également pu constater que, conjointement à l'induction des gènes codant des transporteurs de sulfate tonoplastiques *BnaSultr4.1* et *BnaSultr4.2*, **l'expression des gènes codant les transporteurs de sulfate racinaires *BnaSultr1.1* et *BnaSultr1.2* étaient également très fortement** augmentée (+190 et 1043 %, respectivement) en réponse à la privation en S et ce dès le 1^{er} jour de traitement (Figure 8A, Chap. III). L'augmentation de l'expression de ces gènes a été déjà largement décrite dans la littérature (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004b ; Abdallah *et al.*, 2010) et de façon plus originale, elle s'accompagne d'une augmentation tout aussi précoce et significative de la teneur en Mo dans les feuilles (Figure 4C-D, Chap. V). En termes de cinétique de réponse, lors de l'expérimentation en conditions contrôlées, **l'accumulation de Mo suit exactement la dynamique d'induction du gène codant le transporteur *Sultr1.1*** pendant les 7 premiers jours de privation comme le suggère l'encart de la figure 3D, Chap. V. L'ensemble de ces résultats suggère que le Mo serait transporté par les transporteurs de sulfate. Toutefois, cette hypothèse devrait être vérifiée *via* l'utilisation de mutants Knock-Out *sultr1.1* d'*Arabidopsis*. Ces expérimentations sont actuellement en cours, en collaboration avec le Professeur S. Kopriva (Université de Cologne). Cependant, cette hypothèse peut d'ores et déjà être appuyée par les résultats obtenus par Shinmachi *et al.* (2010) qui ont montré chez le blé que le transporteur MOT1 ne peut pas expliquer à lui seul l'accumulation forte de Mo en réponse à une limitation en S et que cette augmentation des teneurs en Mo était conjointe à l'augmentation de l'expression des gènes codant les transporteurs de sulfate tels que par exemple *Sultr1.1* et *Sultr4.1*. **L'analyse de la teneur foliaire en**

Mo constituerait donc une méthode indirecte pour suivre l'augmentation de l'expression des transporteurs de sulfate, qui peuvent être considérés comme des indicateurs moléculaires précoces et spécifiques, mais dont l'expression reste difficilement mesurable au champ. Même si Shinmachi *et al.* (2010) ont mesuré l'expression de divers transporteurs lors d'expérimentation au champ et que Howarth *et al.* (2009) défend l'idée d'utiliser les modifications d'expression des gènes comme indicateur de la nutrition soufrée, cela nous semble difficilement envisageable dans un contexte de développement d'un OAD pouvant donner un diagnostic rapide de l'état de nutrition d'une culture en plein champ. C'est pourquoi, nous nous sommes focalisés sur le dosage des teneurs en Mo, plutôt que sur l'analyse moléculaire de l'expression des gènes, en conditions de plein champ. Ainsi, nous avons montré qu'en conditions de plein champ, **les teneurs foliaires en Mo permettent de différencier significativement un niveau faible de fertilisation soufrée (0 unité de S) d'un niveau élevé (36 unités de S)** (Figure 5D-F, Chap. V). Nous avons aussi pu constater que les teneurs en Mo au champ sont beaucoup plus faibles (de l'ordre du $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) que celles mesurées en conditions contrôlées (de l'ordre du $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Ceci s'explique par la très forte concentration de Mo de la solution nutritive utilisée traditionnellement à l'UMR, mais cela n'affecte pas les modifications relatives induites par le niveau de disponibilité en S. Enfin, nous avons pu montrer que **cette accumulation foliaire de Mo, en réponse à une privation ou à une limitation en S, semble générique** car elle a été observée pour toutes les espèces végétales que nous avons testées à savoir le maïs, le blé, la tomate, le chou-fleur et le pois (Tableau 2, Chap. V).

L'ensemble de nos résultats nous a permis de proposer deux indicateurs de la nutrition soufrée : le premier correspondant au ratio $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$, dont la réponse à la limitation en S est précoce. Cet indicateur a ensuite été simplifié en utilisant des analyses élémentaires plutôt qu'anioniques (Figure 3, Chap. IV) pour des raisons pratiques qui seront exposées plus tardivement. Le ratio **$([\text{Cl}^-]+[\text{P}]):[\text{S}]$ qui en résulte sera, dans la suite du document, qualifié d'indicateur de remobilisation** puisqu'il traduit la compensation osmotique consécutive à la remobilisation du sulfate. Le deuxième indicateur proposé est le ratio **$[\text{Mo}]:[\text{S}]$** , dont la variation, encore plus précoce que l'indicateur précédent, révèle l'induction massive de l'expression des gènes codant les transporteurs racinaires *BnaSultr1.1* et *BnaSultr1.2* aboutissant à une augmentation rapide de l'absorption du molybdate lors d'une limitation en S. **Par simplification, nous qualifierons dans la suite du document ce ratio $[\text{Mo}]:[\text{S}]$ d'indicateur d'absorption.**

Compte tenu de l'indépendance des processus physiologiques impliqués, les indicateurs d'absorption et de remobilisation sont complémentaires et leur utilisation conjointe pourrait permettre de lever certains risques d'interférences qui seront discutés dans la suite du document.

I.2. Mise en œuvre d'une méthode simple de mesure des indicateurs en conditions de plein champ

I.2.1. Echantillonnage et prélèvement des feuilles

Dans le cadre de la mise en œuvre d'une méthode de mesure simple des indicateurs, il était important de ne pas se focaliser sur un rang de feuilles précis à prélever mais de proposer une description simple du type de feuilles à prélever par les agriculteurs. Lors de notre étude visant à tester nos indicateurs en conditions de plein champ, nous avons ciblé deux types de feuilles : les feuilles matures correspondant aux feuilles du bas du couvert et les feuilles jeunes correspondant à celle du haut du couvert végétal. Contrairement à ce qui a été reporté dans la littérature (Schnug et Haneklaus, 1998 ; Blake-Kalff *et al.*, 2000a) et observé lors de notre expérimentation en conditions contrôlées (Figure 8C, Chap. III et Figure 4E-F, Chap. V), **les feuilles matures de colza en condition de plein champ répondaient plus fortement que les feuilles jeunes aux différents niveaux de fertilisation soufrée**. Toutefois, il faut considérer que les feuilles jeunes (« New emerging leaves »), analysées en conditions contrôlées et donc en situation extrême (privation totale de S), se sont développées en absence totale d'apport de S, ce qui n'est pas le cas des feuilles jeunes en conditions de plein champ, pour lesquelles on peut imaginer une disponibilité certes faible en S mais avec un apport par absorption plus ou moins constant. Le nombre de feuilles à prélever est également un facteur important à prendre en compte, il doit permettre d'être assez représentatif de la parcelle mais ne doit pas être trop contraignant pour permettre un prélèvement rapide. Pour la culture de colza, nous avons choisi de prélever 20 feuilles de plantes différentes afin d'intégrer la variabilité intra-parcellaire et d'avoir une quantité d'échantillon suffisante pour procéder à l'ensemble des analyses envisagées. Si le prélèvement de 20 feuilles âgées semble convenir pour le colza, il serait probablement nécessaire de l'adapter pour d'autres cultures, telles que celle du blé ou du maïs par exemple.

I.2.2. Méthodes d'analyse requises

Au delà des démarches précédentes, nous avons aussi cherché à développer des méthodes de mesures simples et utilisables en plein champ avec l'objectif à moyen terme de développer un OAD. La première approche a consisté à utiliser des bandelettes colorimétriques afin de doser les concentrations des anions d'intérêt pour l'indicateur de remobilisation dans le jus cellulaire extrait des feuilles. Des essais successifs nous ont permis de montrer qu'une extraction optimale des anions peut être tout d'abord assurée par congélation de disques foliaires à l'intérieur d'une seringue puis par pression sur la seringue après décongélation pour extraire le jus cellulaire. Une

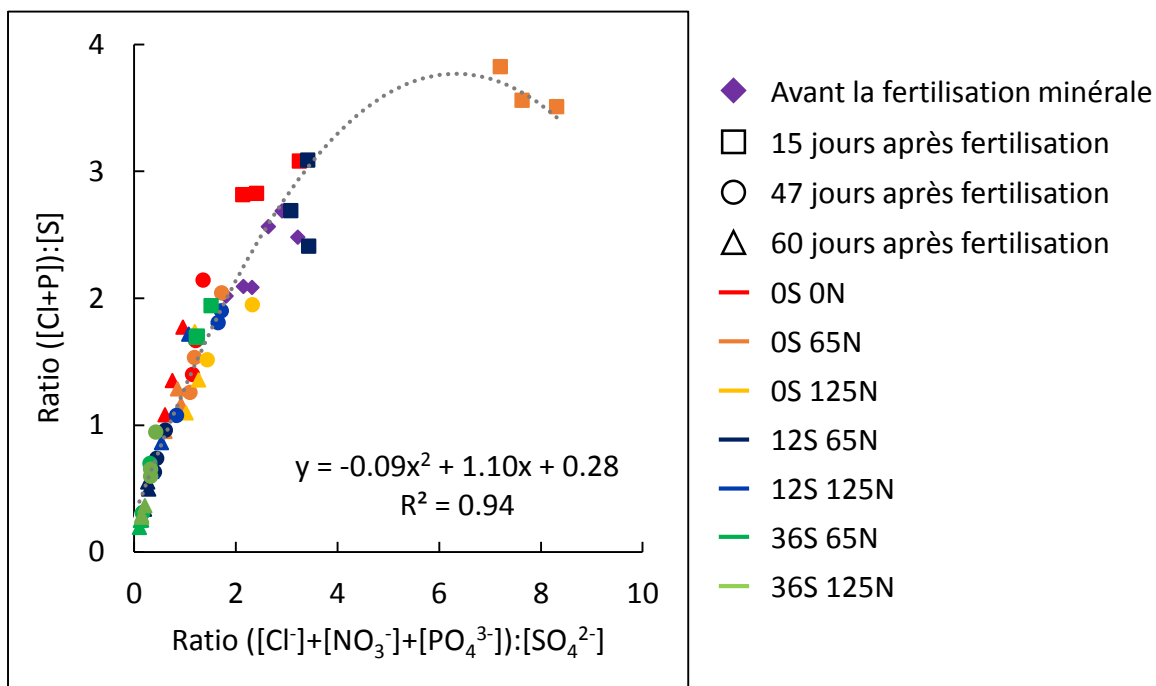


Figure VI.2 Corrélation entre le ratio $([Cl^-]+[NO_3^-]+[PO_4^{3-}]):[SO_4^{2-}]$ et le ratio $([Cl+P]):[S]$, indicateur de remobilisation des feuilles matures du colza soumis à différents niveaux de fertilisation N et S (en $kg \cdot ha^{-1}$ de fertilisant) lors de l'expérimentation menée sur une parcelle oligotrophe en S pour l'ensemble des dates de prélèvement (avant fertilisation, 15, 47 et 60 jours après fertilisation).

analyse des extraits obtenus par des bandelettes colorimétriques de type Merck® permet de différencier des parcelles fertilisée ou non en S, mais avec toutefois une relative imprécision. En effet, cette analyse semi quantitative fournit une gamme de concentrations dans laquelle se situe l'échantillon, liée de plus à l'appréciation de la couleur de la bandelette par l'expérimentateur.

Dans un deuxième temps et dans le cadre d'une collaboration initiée entre le CMI du groupe Roullier et la société NG Biotech, nous avons participé à l'élaboration d'un système de détection colorimétrique reposant sur une détection immunologique indirecte du SO_4^{2-} . Si les premiers résultats étaient prometteurs (forte précision même pour les faibles teneurs), nous n'avons pas poursuivi cette approche compte tenu notamment des coûts de développement requis pour les autres anions (NO_3^- , PO_4^{3-} et Cl^-)

La troisième démarche envisagée, en partie rapportée dans le chapitre IV des résultats, visait à estimer indirectement la teneur en anions grâce à la quantification des éléments principaux qui les composent. Nous avons ainsi démontré que les teneurs en Cl^- , SO_4^{2-} et dans une moindre mesure en PO_4^{3-} pouvaient être estimées par l'intermédiaire des teneurs en Cl, S ou P (Figure 2, Chap. IV). Le NO_3^- , compte tenu de son faible niveau d'accumulation en condition de plein champ, n'a pas été pris en compte pour la construction de **l'indicateur de remobilisation $([\text{Cl}^-]+[\text{P}]):[\text{S}]$** . Ce dernier **est par ailleurs fortement corrélé avec le ratio anionique $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$** (R^2 de 0,94 ; Figure VI.2). Enfin, un autre avantage d'une quantification élémentaire (plutôt que de celle des anions), réside dans le fait que l'échantillon à analyser n'a pas nécessité à être conservé au froid entre l'échantillonnage et son analyse, ce qui permet une plus grande flexibilité.

Nous avons ensuite testé des méthodes de quantification reposant sur des technologies assez récentes dont l'utilisation est pour l'instant restreinte aux domaines de la géologie, de l'analyse des sols ou des métaux. **L'analyse par fluorescence des rayons X, disponible sous forme d'appareils portables** permet, selon les fabricants, de quantifier *via* une mesure unique, pratiquement tous les éléments du tableau périodique dont la masse atomique (M) est comprise entre celle du magnésium (M=24) et celle de l'uranium (M=238). Nous avons donc testé un de ces équipements (Figure VI.3A), en utilisant des poudres végétales préalablement analysées par ICP-MS-HR et **montré que la quantification en quelques minutes des concentrations en S et en P était possible** dans la gamme de concentrations trouvées usuellement dans les tissus végétaux (Figure VI.3B-C). De façon identique, en procédant à des apports d'ajouts dosés de NaCl à une poudre de saccharose, la **quantification du Cl est elle aussi possible** (Figure VI.3D). Par contre, l'analyse du Mo requise pour l'indicateur d'absorption, s'est avérée plus difficile compte tenu d'une sensibilité insuffisante de l'équipement pour détecter de faibles concentrations en Mo comme celles trouvées au champ chez le colza ($[\text{Mo}] < 3$ ppm). Il conviendra alors soit d'optimiser cette technologie (compression préalable de l'échantillon végétal par exemple) afin de pouvoir doser les

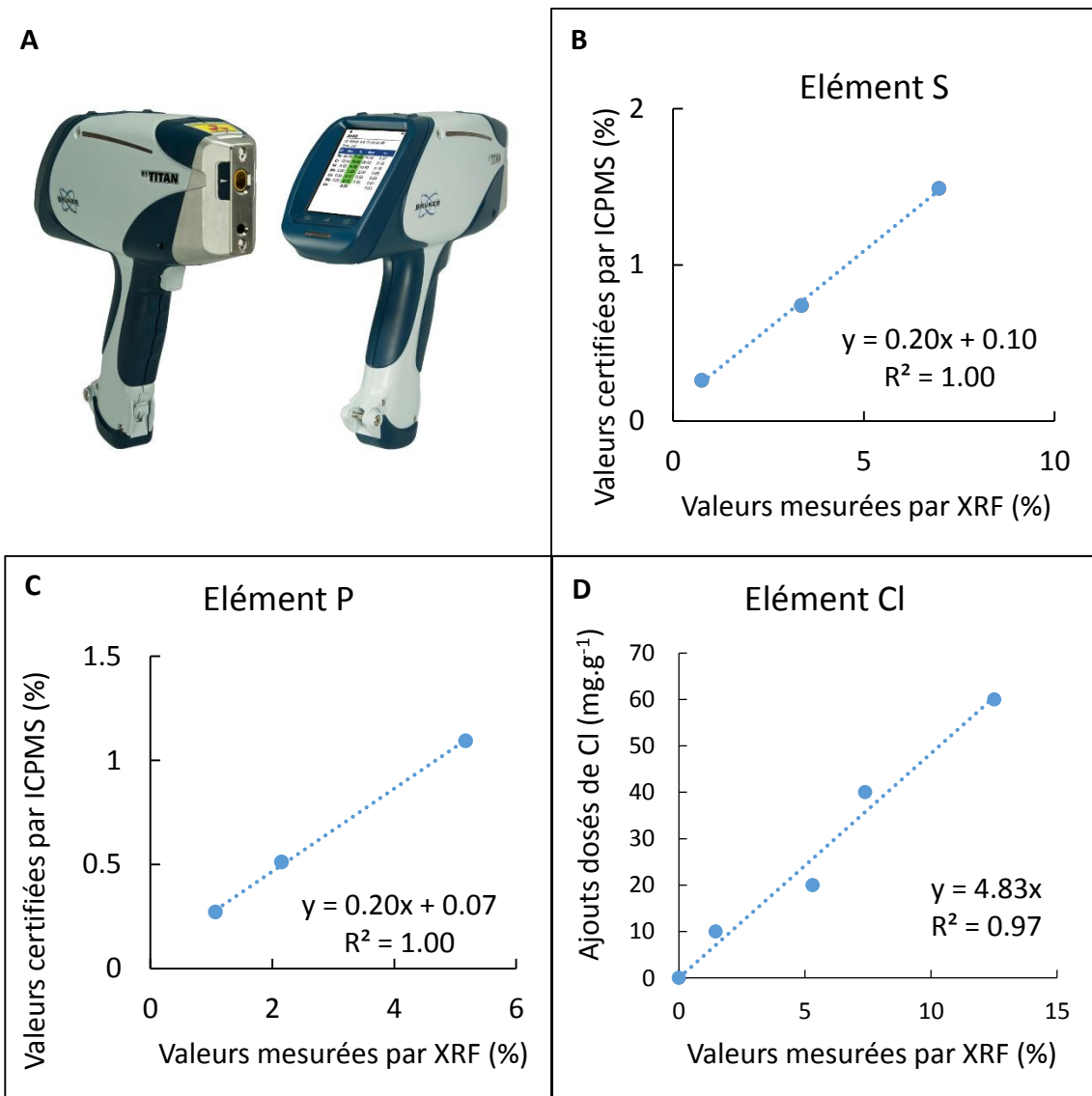


Figure VI.3 (A) Spectrophotomètre XRF (X-ray fluorescence) portable de la marque Bruker permettant, selon le fabricant, la quantification de pratiquement tous les éléments du tableau périodique compris entre le magnésium et l'uranium. Courbes de calibration du XRF pour des échantillons végétaux pour **(B)** le S et **(C)** le P en fonction de la teneur mesurée par ICP-MS-HR (spectromètre de masse haute résolution couplé à une torche plasma, Element 2, ThermoFisher). La calibration pour **(D)** le Cl a été réalisée à partir d'ajouts dosés de NaCl à une poudre de saccharose. Les coefficients de corrélation (R^2) sont indiqués pour chaque droite.

faibles teneurs en Mo, soit d'utiliser une technique de laboratoire offrant une meilleure résolution (Torche plasma couplée à un spectromètre de masse ou à un détecteur optique, de type ICP-MS ou ICP-OES).

I.2.3. Interprétation des indicateurs et choix des valeurs seuils

Le succès du diagnostic dépend du choix déterminant et pertinent de la valeur critique, qui à défaut peut entraîner des erreurs de diagnostic de l'état de nutrition de la culture. Dans notre étude, les valeurs seuils des indicateurs de remobilisation et d'absorption ont été calculées à partir des données obtenues lors de l'expérimentation au champ sur la parcelle oligotrophe en S, selon l'intervalle de confiance à 95 % des valeurs moyennes des parcelles bien alimentées en S ($36 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) et des parcelles non-alimentées en S ($0 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$). Au vu des variations des ratios au cours du développement de la plante, deux groupes de valeurs seuils ont été déterminés, l'un adapté à la période de pré-floraison et l'autre en post-floraison. Ceci impose donc une contrainte de ne pas pouvoir utiliser les mêmes valeurs seuils tout au long de la culture alors que d'autres indicateurs le permettraient comme le ratio malate:sulfate. Les seuils ainsi calculés ont permis de classer les parcelles au sein de trois groupes en fonction de leur statut soufré : suffisant en S, à risque ou déficient en S. En général dans la littérature, pour un indicateur donné, les auteurs proposent une seule valeur seuil unique permettant de discriminer les cultures suffisantes ou déficientes en S. Dans notre étude nous considérons une classe intermédiaire supplémentaire (à risque de déficience en S) ce qui nous permet de tenir compte de la zone d'incertitude du diagnostic. Compte tenu de la disponibilité d'échantillons de feuilles de colza obtenus sur deux réseaux de parcelles agricoles (issus d'une part d'une enquête menée par le CMI et assurée par Datagri et d'autre part de l'étude de Sarda *et al.* (2014), nous avons testé l'utilisation de ces seuils afin de déterminer la prévalence, à priori, d'une limitation de la nutrition soufrée. L'indicateur d'absorption (Figure 6, Chap. V) et l'indicateur de remobilisation (Figure 4, chapitre IV) utilisés en période de pré-floraison et donc de fertilisation suggèrent respectivement que 40 à 58 % des parcelles sont déficientes en S, 33 à 24 % seraient exposées à un risque de déficience en S, alors que 27 à 18 % ne seraient pas limitées en S. En période post-floraison, l'indicateur de remobilisation suggère que 55, 36 et 9 % des parcelles sont déficiente en S, à risque de déficience en S et suffisante en S, respectivement. Il s'agit toutefois d'une approche qui reste exploratoire, les valeurs seuils n'ayant été déterminées qu'à partir d'une seule parcelle expérimentale et que l'effet d'une éventuelle limitation de la nutrition S n'a pas été validée par des mesures de rendement ou de qualité des graines du réseau de parcelles utilisées. **Il sera donc nécessaire de réévaluer et d'affiner les valeurs seuils pour un diagnostic plus fiable du**

Tableau VI.2 Principales caractéristiques des indicateurs de remobilisation (([Cl]+[P]):[S]) et d'absorption ([Mo]:[S]) proposés comme indicateur de la nutrition soufrée.

Caractéristiques de la réponse	Indicateur de remobilisation ([Cl]+[P]):[S]	Indicateur d'absorption [Mo]:[S]
Précocité	+	++
Ampleur	+	+
Sensibilité	+	+
Durabilité	+	+
Stabilité	-	-
Spécificité	?	?
Facilité de mesure	++	+ (S) et - (Mo)

statut soufré des cultures de colza, les pistes envisagées seront exposées dans la partie « Perspectives » de ce document.

I.3. Intérêts d'une utilisation conjointe des indicateurs de remobilisation et d'absorption

Le **Tableau VI.2** résume les caractéristiques principales que doit posséder un bon indicateur de la nutrition soufrée et indique si les deux indicateurs proposés répondent ou non à ces critères. Comme nous avons pu le voir précédemment, **les indicateurs de remobilisation et d'absorption possèdent des caractéristiques essentielles comme la précocité, l'ampleur de variation, la sensibilité, la durabilité de la réponse et potentiellement une certaine facilité de mesure** (excepté pour le Mo qui nécessiterait une quantification en laboratoire). Nous avons également pu constater que **ces deux indicateurs diminuent au cours du développement de la plante (Figure 3, Chap. IV et Figure 5, Chap. V), de même que les valeurs seuils que nous avons estimées (pré- et post-floraison)**. Il n'en subsiste pas moins que l'intérêt de ces indicateurs réside avant tout sur une utilisation pour optimiser la fertilisation donc à un stade précoce antérieur à la montaison ou à la floraison. De plus, l'utilisation de ces ratios représente un avantage considérable par rapport à l'utilisation des valeurs absolues comme les teneurs en S total ou en sulfate qui présentent une variabilité sans chronologie cohérente au cours du développement de la plante (Blake-Kalff *et al.*, 1998., 2000a).

Nous avons cherché à déterminer les corrélations potentielles entre les indicateurs proposés et vis-à-vis d'autres paramètres que nous avons mesurés lors de l'expérimentation au champ. Les corrélations obtenues présentées dans le **Tableau VI.3** révèlent d'une part, que ces deux indicateurs sont positivement et linéairement corrélés (**Figure VI.4**) avec cependant un niveau de corrélation modeste ($R^2 = 0,63$). Ce dernier élément laisse donc penser qu'ils présentent statistiquement, malgré leur co-évolution, une relative indépendance, au regard des mécanismes physiologiques qui les déterminent. D'autre part, les indicateurs de remobilisation et d'absorption sont aussi étroitement corrélés à la teneur en S (**Figure VI.5**, $R^2 = 0,79$ et $0,81$, respectivement). Cette ajustement souligne que pour des teneurs foliaires en S allant de 5 à 15 mg.g^{-1} MS, ces deux indicateurs diminuent sinon de façon linéaire, au moins proportionnellement. Pour des valeurs proches de 5 mg S.g^{-1} MS, les deux indicateurs présentent une gamme de variation plus importante, ce qui pourrait traduire une plus forte sensibilité à une limitation en S. De façon identique, des ajustements sous forme de fonction puissance, avec des corrélations significatives (**Tableau VI.3**) ont été aussi obtenus avec les teneurs en S-SO_4^{2-} , ou avec les ratios $[\text{S-SO}_4^{2-}]:[\text{S}]$ et $[\text{N}]:[\text{S}]$, ce qui pourraient permettre les mêmes interprétations que précédemment. **Dès lors et de façon plus**

Tableau VI.3 Tableau présentant les coefficients de corrélation R^2 , entre l'indicateur de remobilisation ($[(C]+[P]):[S]$), l'indicateur d'absorption ($[Mo]:[S]$) et différents paramètres qui ont été mesurés $[C]:[S]$, $[P]:[S]$, $[Stotal]$, $[S-SO_4^{2-}]$, $[S-SO_4^{2-}]:[Stotal]$ et $[N]:[S]$ dans les feuilles matures lors de l'expérimentation en conditions de plein champ sur une parcelle oligotrophe en S. Les données utilisées pour ces corrélations sont en $mg.g^{-1}$ de matière sèche. Les équations de corrélations sont soit de type linéaire (L, $Y=a.X+b$), soit de type puissance (P, $Y=c.X^d$).

Paramètres mesurés	Indicateur absorption $10^4 [Mo]:[S]$	Indicateur mobilisation $[(C)+[P]):[S]$	$[C]:[S]$	$[P]:[S]$	$[Stotal]$	$[S-SO_4^{2-}]$	$[S-SO_4^{2-}]:[Stotal]$	$[N]:[S]$
$10^4 [Mo]:[S]$	1,0							
$[(C)+[P]):[S]$	0,63 (P)	1,0						
$[C]:[S]$	0,58 (P)	0,99 (L)	1,0					
$[P]:[S]$	0,68 (P)	0,82 (L)	0,75 (L)	1,0				
$[Stotal]$	0,82 (P)	0,79 (P)	0,73 (P)	0,82 (P)	1,0			
$[S-SO_4^{2-}]$	0,76 (P)	0,73 (P)	0,68 (P)	0,71 (P)	0,94 (L)	1,0		
$[S-SO_4^{2-}]:[Stotal]$	0,55 (P)	0,52 (P)	0,56 (L)	0,85 (L)	0,63 (P)	0,89 (P)	1,0	
$[N]:[S]$	0,74 (P)	0,72 (P)	0,66 (P)	0,89 (L)	0,83 (P)	0,90 (P)	0,78 (P)	1,0

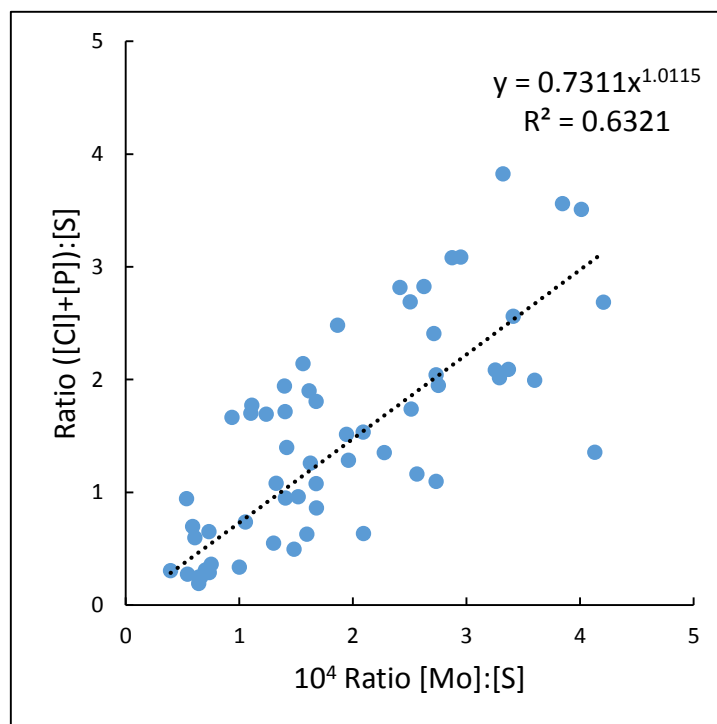


Figure VI.4 Corrélation entre l'indicateur d'absorption ($[Mo]:[S]$) et l'indicateur de remobilisation ($[(C)+[P]):[S]$) des feuilles matures du colza soumis à différents niveaux de fertilisation N et S (en $kg.ha^{-1}$ de fertilisant) lors de l'expérimentation menée sur une parcelle oligotrophe en S pour l'ensemble des dates de prélèvements (avant fertilisation, 15, 47 et 60 jours après fertilisation).

globale, il apparaît que les indicateurs de remobilisation et d'absorption présentent une plus forte sensibilité que les analyses de S, de SO_4^{2-} ou des paramètres composites qui pourraient en être dérivés, en particulier dans des conditions de limitation en S. Enfin, il existe une relation linéaire très forte ($R^2=0,99$, **Tableau VI.3**) entre le ratio $([\text{Cl}]+[\text{P}]):[\text{S}]$ et le ratio $[\text{Cl}]:[\text{S}]$ qui suggère que le P contribue de façon mineure à l'indicateur de remobilisation. Néanmoins, les ratios $([\text{Cl}]+[\text{P}]):[\text{S}]$ et $[\text{P}]:[\text{S}]$ sont également très bien corrélés de façon linéaire avec un R^2 de 0,82 (**Tableau VI.3**). Ce facteur P semble donc pertinent à conserver dans l'indicateur de remobilisation pour deux raisons principales. La première repose sur le fait qu'une fertilisation élevée en P peut augmenter les effets d'une limitation en S (Abdin *et al.*, 2003), et la deuxième, sur le fait que les ions PO_4^{3-} et Cl^- pourrait d'un point de vue osmotique permettre une inter-compensation au moins partielle (comme le suggèrent les résultats obtenus lors d'une privation en Cl (**Figure 3C, Chap. III**)). Cette dernière pourrait avoir lieu dans des sols riches en Cl ou en P ou inversement.

Nous n'avons pas cherché à valider expérimentalement **la spécificité** des deux indicateurs proposés. Cependant, au cours de nos expérimentations, nous avons quand même abordé indirectement l'effet d'une fertilisation azotée (**Figure 1, Chap. IV et Figure 5, Chap. V**). Ainsi, nous avons montré que la fertilisation N, en augmentant la croissance, accroît la demande en S. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Blake-Kalff *et al.* (2004) sur l'impact de la fertilisation N sur le ratio malate:sulfate. Compte tenu de la composition de nos indicateurs, certaines conditions susceptibles de réduire leur spécificité pourraient être à priori envisagées tels que des sols atypiques riches en P, en Cl ou en Mo. Toutefois, l'utilisation simultanée de ces deux indicateurs (d'absorption et de remobilisation) pourrait alors permettre de s'affranchir ces parcelles atypiques. De plus, des travaux récents (Billard *et al.*, 2014 ; 2015, Maillard *et al.*, en cours de soumission, Communication Personnelle), montrent que l'absorption du Mo est stimulée lors d'une limitation en S mais aussi, dans une moindre mesure, par des limitations en Fe, en Mn, en Zn, en Cu ou en B, qui impacteraient indirectement le métabolisme du S (limitations en Fe, en Mn ou en B) ou celui du Mo (limitations en Cu et Zn requis pour la synthèse du facteur Moco). De telles interférences, dont l'occurrence n'est peut-être pas très importante, pourraient être aussi résolues par l'utilisation conjointe des deux indicateurs ou de façon additionnelle, par l'analyse de la teneur de ces éléments interférents, si une analyse multi-élémentaire des échantillons végétaux est assurée. **L'utilisation conjointe des indicateurs de remobilisation et d'absorption, présentant une relative indépendance et une complémentarité, permettrait de remédier à d'éventuels manques de spécificité résultant de possibles interactions nutritionnelles.**

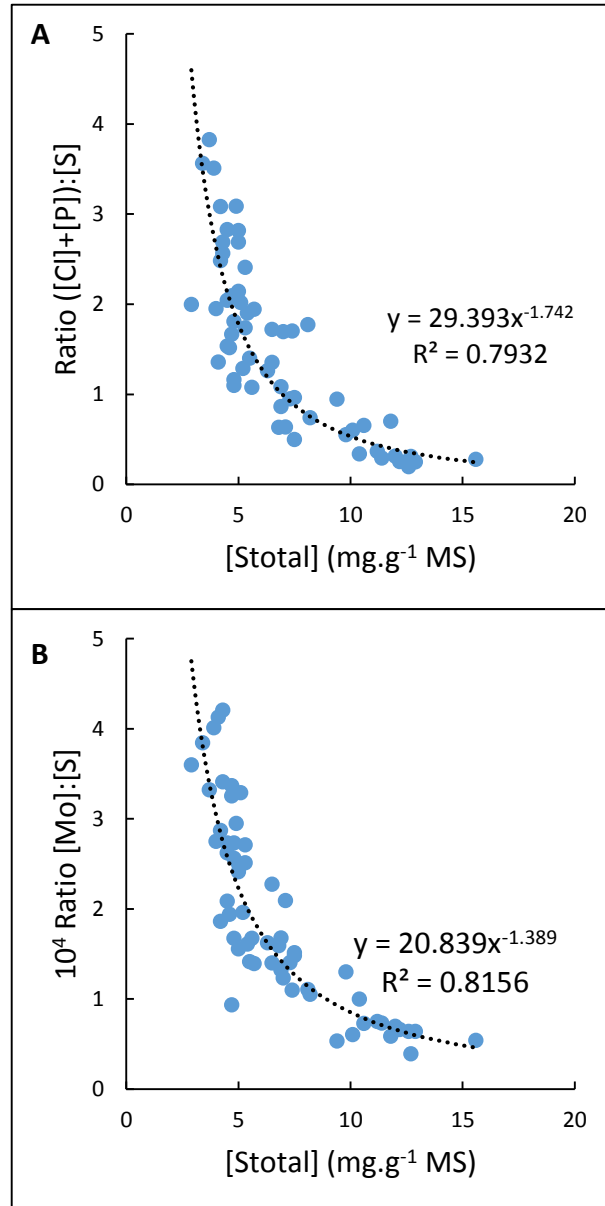


Figure VI.5 Corrélation **(A)** entre l'indicateur de remobilisation ($([Cl+P]):[S]$) et le $[S$ total] et **(B)** entre l'indicateur d'absorption ($[Mo]:[S]$) et le $[S$ total] des feuilles matures du colza soumis à différents niveaux de fertilisation N et S (en $kg.ha^{-1}$ de fertilisant) lors de l'expérimentation menée sur une parcelle oligotrophe en S pour l'ensemble des dates de prélèvement (avant fertilisation, 15, 47 et 60 jours après fertilisation). MS : matière sèche.

II. Perspectives de recherche et de développement

L'ensemble de ces recherches nous a permis d'identifier puis de valider en conditions de plein champ deux indicateurs de la nutrition soufrée chez le colza, potentiellement transférables à d'autres espèces cultivées. Des perspectives en découlent tant du point de vue des recherches requises à un niveau fondamental que des applications qui peuvent en être dérivées.

II.1. Perspectives de recherche au niveau fondamental

La première perspective de recherche requise par nos travaux repose sur l'hypothèse que le molybdate est effectivement absorbé par le transporteur de sulfate racinaire *Sultr1.1* comme le suggèrent les données provisoires que nous avons fournies dans le [chapitre V](#) concernant le contenu ionomique des feuilles de mutants d'*Arabidopsis* (Mutant Knock-Out (KO) *sultr1.2* pour lequel l'absorption de S et de Mo est augmentée potentiellement suite à une surexpression d'*AtSultr1.1*, [Tableau 3](#), [Chap. V](#)). Cette hypothèse pourrait être testée par **une analyse des mutants simples *Atsultr1.1* et *Atsultr1.2* combinant la mesure de l'absorption du sulfate et du molybdate et la quantification des transcrits**. Cette expérimentation est actuellement en cours de réalisation en collaboration avec le Professeur S. Kopriva de l'Université de Cologne.

L'un des résultats originaux obtenus lors de ce travail porte sur l'implication forte du chlorure dans le potentiel osmotique foliaire, tant en conditions contrôlées qu'en plein champ et soulève de nombreuses questions quant aux régulations potentiellement impliquées. Dans ce contexte, l'analyse de l'expression des transporteurs de chlorure (par exemple CLCa ([De Angeli et al., 2009](#)), SLAC1 et SLAH3 ([Krapp et al., 2014](#))) et/ou l'utilisation de mutants KO pourraient permettre de mieux appréhender les régulations sous-jacentes. Par ailleurs, certains transporteurs impliqués dans le transport du chlorure étant également capables de transporter le nitrate, l'analyse des mutants KO devraient permettre de considérer les interactions nutritionnelles et notamment de préciser leur rôle dans le contrôle du potentiel osmotique. **Appréhender les inter-compensations osmotiques entre les anions que nous avons étudiés supposerait alors de se focaliser sur leurs transporteurs localisés au niveau du tonoplaste.**

Compte tenu des priorités au cours de la thèse associées aux contraintes de temps, les analyses métabolomiques des échantillons de colza soumis à une privation de S réalisées en collaboration avec la Plateforme de Chimie du Végétal de l'INRA de Versailles n'ont été exploitées

que partiellement. Même si les acides aminés, acides organiques et sucres solubles n'ont pas montré de réponses précoces à une privation en S, l'étude individuelle des quelques 150 métabolites dosés, en particulier soufrés, pourrait être envisagée afin **d'identifier des indicateurs métaboliques de la nutrition soufrée chez le colza.**

Nous avons à priori identifiés quelques facteurs qui pourraient interférer avec la spécificité des indicateurs proposés mais **d'autres risques pourraient être rapidement évalués.** Il a été montré par exemple pour quelques indicateurs azotés que certains paramètres utilisés (par exemple teneur en nitrate pour la méthode Jubil® (Justes, 1993)) pouvaient présenter une certaine variabilité lors du cycle jour/nuit. S'il paraît à priori peu probable que les teneurs en SO_4^{2-} , de Cl^- et de PO_4^{3-} présentent une telle variabilité, il faut toutefois considérer que leur implication osmotique puisse être affectée par l'accumulation de glucides et donc par la photosynthèse. Une étude cinétique, sur un pas de temps de 24 heures, permettrait une vérification relativement aisée.

Lors de ces travaux de recherche nous avons mis en évidence des interactions fortes entre le S et le Mo, déjà connues chez le blé. La déclinaison de cette interaction a permis d'obtenir une application en tant qu'indicateur de la nutrition soufrée : le ratio $[\text{Mo}]:[\text{S}]$. Parmi les 17 éléments requis pour une croissance optimale des végétaux, **d'autres indicateurs pourraient être développés selon la même stratégie visant à identifier d'autres interactions nutritionnelles.** En effet, la littérature suggère, au moins en conditions contrôlées, d'autres situations où certains transporteurs aspécifiques, régulés positivement par une carence en un élément, pourraient conduire à une absorption accrue d'autres éléments minéraux. C'est le cas par exemple du Na et du K avec les transporteurs HKT1, LCT1 ou NSC (Shachtman et Liu, 1999; Malvi, 2011). On pourrait donc envisager que le ratio $[\text{Na}]:[\text{K}]$ permette un diagnostic de la nutrition potassique. Un autre cas d'interaction pourrait être pertinent à étudier, celui des transporteurs de Fe, IRT1, qui ont également la capacité de transporter d'autres métaux tels que le Zn et le Mn, les faibles niveaux de Fe affectant l'absorption des autres éléments (Baxter *et al.*, 2008; Pilon *et al.*, 2009). L'indicateur de nutrition ferrique sous la forme d'un ratio du type $([\text{Zn}]+[\text{Mn}]):[\text{Fe}]$ pourrait donc être envisageable. Une approche préalable pourrait être considérée, en réutilisant des échantillons disponibles au laboratoire et obtenus lors d'essais d'alimentation contrastée en K ou Fe, pour s'assurer de l'existence de modifications ionomiques des feuilles.

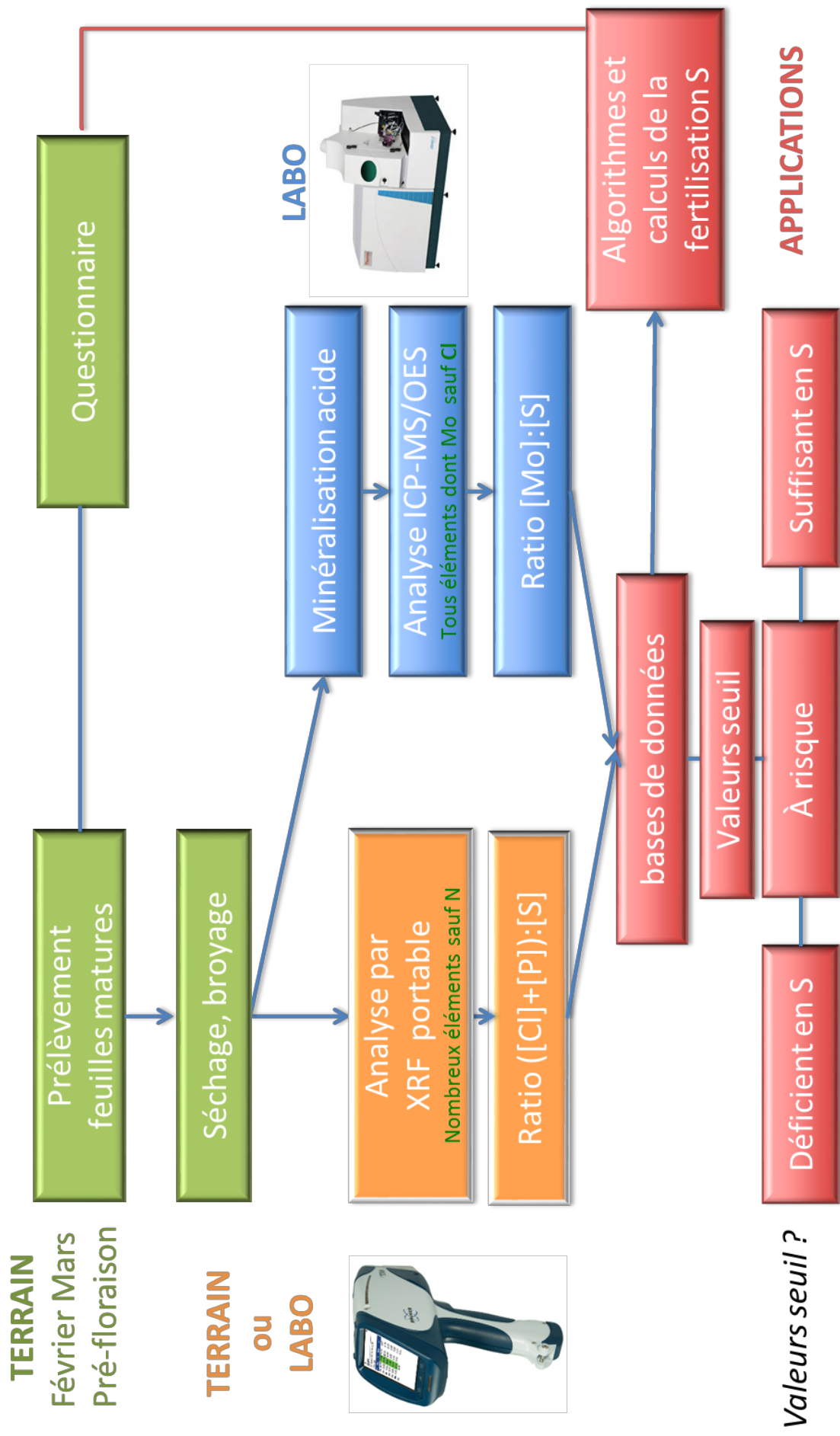


Figure VI.6 Principe de mise en œuvre des indicateurs, de remobilisation (ratio $([Cl]+[P]):[S]$) et d'absorption ($[Mo]:[S]$), de la nutrition soufrée chez le colza.

II.2. Perspectives de développement

Pour remédier à d'éventuelles interactions nutritionnelles et au moins aux plus probables, il a été proposé une utilisation conjointe des indicateurs de remobilisation et d'absorption. Ainsi, il peut être suggéré un principe de mise en œuvre de ces indicateurs de nutrition soufrée (**Figure VI.6**), ce qui nécessiterait les développements suivants :

- **d'un point de vue analytique**, si l'indicateur de remobilisation (teneurs S, P, Cl requises) pourrait être quantifié en conditions de plein champ, moyennant un séchage (par micro-onde par exemple) et un broyage préalables, par un appareil portable de diffraction des rayons X (XRF), le dosage du Mo requis pour l'indicateur d'absorption est plus difficile à réaliser. Même si la sensibilité d'un appareil XRF pour le dosage du Mo pourrait être optimisée (compression de l'échantillon par exemple), il est fort probable que des techniques plus résolutive et inhérentes au laboratoire, de type ICP-MS ou ICP-OES, soient requises. Il faut souligner que ces deux techniques ne sont pas utilisables pour le dosage du Cl.
- **Du point de vue de l'interprétation de ces deux indicateurs**, bien que nous ayons proposé des premières valeurs seuils, il paraît important dans une première phase de les tester afin de les valider sur une échelle plus large. Pour ce faire, évaluer ces indicateurs en pré-floraison, ainsi qu'en post-floraison, permettrait de déterminer la pertinence de la préconisation de fertilisation soufrée apportée entre ces deux périodes. De façon supplémentaire, la prise en compte du rendement obtenu et de la qualité des graines (appréhendée par le ratio N:S ou par la teneur en glucosinolates), permettrait de valider ou d'affiner, à posteriori, les valeurs seuils utilisées et de leur associer des préconisations de fertilisation S. L'ensemble nécessite alors d'obtenir par voie d'enquête les éléments requis pour une exploitation par un algorithme de ces données. Ce questionnaire d'enquêtes devrait permettre d'affiner les informations relatives à la culture au stade pré-floraison (culture antérieure, moyenne pluviométrique de la zone, densité de semis, variété, objectif de rendement, qualité et quantité de fumure organique apportée, prévisions et préconisations de fertilisations N et S...) et post-récolte (rendement réalisé, fertilisation minérale effectivement apportée...). L'analyse de ces données par algorithme permettrait d'augmenter la préconisation de fertilisation S en fonction de certains facteurs de risques

(lessivage important, forte fertilisation N, objectif de rendement élevé...) ou de la réduire (faible lessivage, fort reliquat de S, faible fertilisation N...)

- **En ce qui concerne les interactions éventuelles qui pourraient affecter la spécificité et donc l'efficacité de ces deux indicateurs**, nous avons indiqué que l'absorption du Mo est stimulée massivement par une carence en S et dans une moindre mesure par des carences en Fe, en Mn, en Zn, en Cu ou en B. Bien qu'il s'agisse probablement de situations assez rares, les méthodologies utilisées pour quantifier les deux indicateurs permettent aussi de quantifier ces éléments. Il serait alors possible d'identifier ces cas d'interférences en comparant les valeurs mesurées à des teneurs de référence obtenues sur un grand nombre de parcelles, données qui sont d'ailleurs disponibles.
- **En termes d'extension, nous avons pu démontrer que ces indicateurs développés chez le colza pourraient par ailleurs être utilisés chez d'autres espèces, en particulier de grandes cultures, telles que le blé ou le maïs.** Cela supposerait alors diverses adaptations et plus particulièrement la nécessité d'adapter les valeurs seuils à chaque culture. Moyennant un choix judicieux des feuilles récoltées et en considérant les pratiques culturales spécifiques, une expérimentation en parcelle oligotrophe en S, soumise à différents niveaux de fertilisations S, permettrait d'obtenir une première estimation de ces valeurs seuils selon une méthodologie similaire à celle que nous avons développée pour le colza.

Références bibliographiques



Références bibliographiques

- A -

Abdallah M, Dubousset L, Meuriot F, Etienne P, Avice J-C, Ourry A. 2010. Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2635–2646.

Abdallah M, Etienne P, Ourry A, Meuriot F. 2011. Do initial S reserves and mineral S availability alter leaf S-N mobilization and leaf senescence in oilseed rape? *Plant Science* **180**, 511–520.

Abdin MZ, Ahmad A, Khan N, Khan I, Jamal A, Iqbal M. 2003. Sulphur interaction with other nutrients. In: Abrol YP, Ahmad A, eds. *Sulphur in Plants, First Edition*. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V., 359–374.

Ahmad A, Abdin MZ. 2000a. Effect of sulphur application on lipid, RNA and fatty acid content in developing seeds of rapeseed (*Brassica campestris* L.). *Plant Science* **150**, 71–76.

Ahmad A, Abdin MZ. 2000b. Photosynthesis and its related physiological variables in the leaves of *Brassica* genotypes as influenced by sulphur fertilization. *Physiologia Plantarum* **110**, 144–149.

Alhendawi RA, Kirkby EA, Pilbeam DJ. 2005. Evidence that sulfur deficiency enhances molybdenum transport in xylem sap of tomato plants. *Journal of Plant Nutrition* **28**, 1347–1353.

Ashley MK, Grant M, Grabov A. 2006. Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *Journal of Experimental Botany* **57**, 425–436.

Ayala-Silva T, Beyl CA. 2005. Changes in spectral reflectance of wheat leaves in response to specific macronutrient deficiency. *Advances in Space Research* **35**, 305–317.

- B -

Balík J, Pavlíková D, Tlustos P, Sykora K, Cerny J. 2006. The fluctuation of molybdenum content in oilseed rape plants after the application of nitrogen and sulphur fertilizers. *Plant Soil and Environment* **52**, 301–307.

Balint T, Rengel Z. 2011. Amino acid composition of xylem and phloem sap varies in canola genotypes differing in nitrogen- and sulfur- use efficiency. *Crop and Pasture Science* **62**, 198–207.

Baxter I, Muthukumar B, Park HC, Buchner P, Lahner B, Danku J, Zhao K, Lee J, Hawkesford MJ, Gueriot ML, et al. 2008. Variation in molybdenum content across broadly distributed populations of *Arabidopsis thaliana* is controlled by a mitochondrial molybdenum transporter (MOT1). *PLoS Genetics* **4** (2), e1000004.

Baxter I, Ouzzani M, Orcun S, Kennedy B, Jandhyala SS, Salt DE. 2007. Purdue ionomics information management system. An integrated functional genomics platform. *Plant Physiology* **143**, 600–611.

- Bennett WF.** 1993. Plant nutrient utilization and diagnostic plant symptoms. In: Bennett WF, ed. *Nutrient deficiencies and toxicities in crop plants*. St. Paul: APS Press, 1-7.
- Bettany JR, Stewart JWB, Halstead EH.** 1974. Assessment of available soil sulphur in an ³⁵S growth chamber experiment. *Canadian Journal of Soil Science* **54**, 309–315.
- Billard V, Maillard A, Garnica M, Cruz F, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Ourry A, Etienne P.** 2015. Zn deficiency in *Brassica napus* induces Mo and Mn accumulation associated with chloroplast proteins variation without Zn remobilization. *Plant Physiology and Biochemistry* **86**, 66–71.
- Billard V, Ourry A, Maillard A, Garnica M, Coquet L, Jouenne T, Cruz F, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Etienne P.** 2014. Copper-deficiency in *Brassica napus* induces copper remobilization, molybdenum accumulation and modification of the expression of chloroplastic proteins. *PLoS One* **9**, e109889.
- Bittner F.** 2014. Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. *Frontiers in Plant Science* **5**, 28.
- Blake-Kalff MMA, Harrison KR, Hawkesford MJ, Zhao FJ, McGrath SP.** 1998. Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiology* **118**, 1337–1344.
- Blake-Kalff MMA, Hawkesford MJ, Zhao FJ, McGrath SP.** 2000a. Diagnosing sulfur deficiency in field grown oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Soil* **225**: 95–107.
- Blake-Kalff MMA, Zhao FJ, Hawkesford J, McGrath SP.** 2000b. Diagnosis of sulphur deficiency in oilseed rape and wheat. *HGCA Project Report N° 217*. London: Home-Grown Cereals Authority.
- Blake-Kalff MMA, Zhao FJ, Hawkesford MJ, McGrath SP.** 2001. Using plant analysis to predict yield losses caused by sulphur deficiency. *Annals of Applied Biology* **138**, 123–127.
- Blake-Kalff MMA, Zhao FJ, McGrath SP, Withers PJA.** 2004. Development of the malate:sulphate ratio test for sulphur deficiency in winter wheat and oilseed rape. *HGCA Project Report N° 327*. London: Home-Grown Cereals Authority.
- Bourgis F, Roje S, Nuccio ML, Fisher DB, Tarczynski MC, Li C, Herschbach C, Rennenberg H, Pimenta MJ, Shen TL, et al.** 1999. S-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *The Plant Cell* **11**, 1485–1498.
- Bourrié B.** 2007. La fluorescence chlorophyllienne comme outil de diagnostic. 8^{èmes} Journées de la fertilisation raisonnée et de l'analyse de terre. *GEMAS-COMIFER - Fertilisation raisonnée et analyse de terre : quoi de neuf en 2007*. Blois 20-21/11/2007.
- Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F.** 2012. Function of nutrients: micronutrients. In: Marschner P, ed. *Marschner's Mineral Nutrition Higher Plants, Third Edition*. San Diego: Academic Press, 191–248.
- Brunel-Muguet S, D'Hooghe P, Bataille MP, Larre C, Kim TH, Trouverie J, Avice JC, Etienne P, Duerr C.** 2015a. Heat stress during seed filling interferes with sulfur restriction on grain composition and seed germination in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Frontiers in Plant Science* **6**, 213.

Brunel-Muguet S, Mollier A, Kauffmann F, Avice JC, Goudier D, Sénécal E, Etienne P. 2015b. SuMoToRI, an Ecophysiological Model to Predict Growth and Sulfur Allocation and Partitioning in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) until the Onset of Pod Formation. *Frontiers in Plant Science* **6**, 993.

Buchner P, Stuiver CEE, Westerman S, Wirtz M, Hell R, Hawkesford MJ, De Kok LJ. 2004a. Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulfate nutrition. *Plant Physiology* **136**, 3396–3408.

Buchner P, Takahashi H, Hawkesford MJ. 2004b. Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1765–1773.

Bungard RA, Wingler A, Morton JD, Andrews M, Press MC, Scholes JD. 1999. Ammonium can stimulate nitrate and nitrite reductase in the absence of nitrate in *Clematis vitalba*. *Plant, Cell and Environment* **22**, 859–866.

Burns IG, Durnford J, Lynn J, McClement S, Hand P, Pink D. 2012. The influence of genetic variation and nitrogen source on nitrate accumulation and iso-osmotic regulation by lettuce. *Plant and Soil* **352**, 321–339.

Burns IG, Zhang K, Turner MK, Edmondson R. 2011a. Iso-osmotic regulation of nitrate accumulation in lettuce. *Journal of Plant Nutrition* **34**, 283–313.

Burns IG, Zhang K, Turner MK, Lynn J, McClement S, Hand P, Pink D. 2011b. Genotype and environment effects on nitrate accumulation in a diversity set of lettuce accessions at commercial maturity: the influence of nitrate uptake and assimilation, osmotic interactions and shoot weight and development. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**, 2217–2233.

- C -

Cakmak I, Marschner H. 1986. Mechanism of phosphorus-induced zinc deficiency in cotton. I. Zinc deficiency-enhanced uptake rate of phosphorus. *Physiology Plant* **68**, 483–490.

Campbell WH. 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 277–303.

Carver MFF. 2005. Monitoring winter barley, wheat, oilseed rape and spring barley for sulphur in England and Wales to predict fertiliser need. *HGCA Project Report N° 374*. London: Home-Grown Cereals Authority.

Casieri L, Gallardo K, Wipf D. 2012. Transcriptional response of *Medicago truncatula* sulphate transporters to arbuscular mycorrhizal symbiosis with and without sulphur stress. *Planta* **235**, 1431–1447.

- D -

D'Hooghe P. 2013. Impacts de la disponibilité en sulfate sur la physiologie de la feuille et sur la qualité, le métabolisme soufré et la germination de la graine de colza. Thèse de doctorat, Université de Caen Basse-Normandie, 229p.

D'Hooghe P, Dubousset L, Gallardo K, Kopriva S, Avice J-C, Trouverie J. 2014. Evidence for proteomic and metabolic adaptations associated with alterations of seed yield and quality in sulfur-limited *Brassica napus* L. *Molecular and Cellular Proteomics* **13**, 1165–1183.

D'Hooghe P, Escamez S, Trouverie J, Avice J-C. 2013 Sulphur limitation provokes physiological and leaf proteome changes in oilseed rape that lead to perturbation of sulphur, carbon and oxidative metabolisms. *BMC Plant Biology* **13**, 23.

Dauguet S, Evrard J, Hebinger H, Fine F, Merrien A, Quinsac A. 2013. Les multiples usages du colza : huile, tourteaux, graines et appareil végétatif. Dans : Hebinger H ed, *Le colza*. Paris : Editions France Agricole, « Agriproduction », 410-500.

De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse J-M, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H. 2009. CLC-mediated anion transport in plant cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **364**, 195–201.

De Kok LJ, Castro A, Durenkamp M, Koralewska A, Posthumus FS, Stuiver CE, yang L, Stulen I. 2005. Pathways of plant sulfur uptake and metabolism: an overview. *Landbauforschung Völknerode, Special Issue* **283**, 5-13

De Kok LJ, Stulen I, Hawkesford MJ. 2011. Sulfur Nutrition in Crop Plants. In: Hawkesford MJ, Barraclough P, eds. *The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*, **First Edition**. Heidelberg: John Wiley & Sons, Inc., 295–309

Droux M, Ruffet ML, Douce R, Job D. 1998. Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants. *European Journal of Biochemistry* **255**, 235–245.

Dubousset L, Abdallah M, Desfeux AS, et al. 2009. Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3239–3253.

Dubousset L, Etienne P, Avice JC. 2010. Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages? *Journal of Experimental Botany* **61**, 4313–4324.

Dudev T, Lim C. 2004. Oxyanion selectivity in sulfate and molybdate transport proteins: An ab Initio/CDM Study. *Journal of American Chemical Society* **126**, 10296–10305.

- E -

Edmeades DC, Thorrold BS, Roberts AHC. 2005. The diagnosis and correction of sulfur deficiency and the management of sulfur requirements in New Zealand pastures: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **45**, 1205–1223.

Eriksen J, Mortensen JV, Kjellerup VK, Kristjansen O. 1994. Forms and availability of Sulphur in Cattle and Pig Slurry. *Research Report Danish Institute of Plant and Soil Science*.

- F -

Fiehn O. 2006. Metabolite profiling in *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology* **323**, 439–447.

Fimes J, Vong PC, Guckert A, Frossard E. 2000. Influence of sulfur on apparent N-use efficiency, yield and quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown on a calcareous soil. *European Journal of Agronomy* **12**, 127–141.

Fitzpatrick KL, Tyerman SD, Kaiser BN. 2008. Molybdate transport through the plant sulfate transporter SHST1. *FEBS Letters* **582**, 1508–1513.

Foyer CH, Rennenberg H. 2000. Regulation of glutathione synthesis and its role in abiotic and biotic stress defence. Brunold C, Rennenberg H, De Kok LJ, Stulen I eds. *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants*, 127–153.

Foyer CH, Theodoulou FL, Delrot S. 2001. The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in Plant Science* **6**, 486–492.

Freney JR. 1966. How much sulfur do plants require? *Fertility Solutions* **10 (3)**, 14-15.

Freney JR, Spencer K, Jones MB. 1978. Determining the sulphur status of wheat. *Sulphur in Agriculture* **2**, 2-5231.

- G -

Gasber A, Klaumann S, Trentmann O, Trampczynska A, Clemens S, Schneider S, Sauer N, Feifer I, Bittner F, Mendel RR, et al. 2011. Identification of an *Arabidopsis* solute carrier critical for intracellular transport and inter-organ allocation of molybdate. *Plant Biology* **13**, 710–718.

Gaudin Z. 2013. Place de l'azote dans l'interaction plante – plante parasite : *Brassica napus* L. – *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel. Thèse de doctorat, Université de Nantes, 433p.

Grant C.A, Johnston AM and Clayton GW. 2004. Sulphur fertilizer and management of canola and wheat in western Canada. *Canadian Journal Plant Science*. **84**: 453–462.

Grant CA, Mahli SS, Karamanos RE. 2012. Sulfur management for rapeseed. *Field Crops Research* **128**, 119–128.

- H -

- Haneklaus S, Bloem E, Schnug E.** 2008. History of sulfur deficiency in crops. In: Jez J, ed. *Sulfur: A Missing Link between Soils, Crops, and Nutrition*. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 45-58.
- Haneklaus S, Brauer A, Bloem E, Schnug E.** 2005. Relationship between sulfur deficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its attractiveness for honeybees. *Landbauforschung Völkenrode Special Issue* **283**, 37-43.
- Haneklaus S, Schnug E.** 1992. Baking quality and sulphur content of wheat. D. Evaluation of the relative importance of genetics and environment including sulphur fertilisation. *Sulphur in Agriculture* **16**, 335-338.
- Harris J, Schneberg KA, Pilon-Smits EAH.** 2014. Sulfur-selenium-molybdenum interactions distinguish selenium hyperaccumulator *Stanleya pinnata* from non-hyperaccumulator *Brassica juncea* (Brassicaceae). *Planta* **239**, 479–491.
- Hawkesford MJ.** 2000. Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. *Journal of Experimental Botany* **51**, 131–138.
- Hawkesford MJ.** 2003. Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family — redundancy or specialization? *Physiology Plant* **117**, 155–163.
- Hawkesford MJ, Buchner P, Hopkins L, Howarth JR.** 2003. The plant sulfate transporter family: specialized functions and integration with whole plant nutrition. In: Davidian JC, Grill D, De Kok LJ, Stulen I, Hawkesford MJ, Schnug E, Rennenberg H eds. *Sulfur Transport and Assimilation in Plants: Regulation, Interaction, Signaling*. Leiden: Backhuys Publishers, 45-56.
- Hawkesford MJ, Davidian JC, Grignon C.** 1993. Sulphate/proton cotransport in plasma-membrane vesicles isolated from roots of *Brassica napus* L.: increased transport in membranes isolated from sulphur-starved plants. *Planta* **190**, 297-304.
- Hawkesford MJ, De Kok LJ.** 2006. Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell and Environment* **29**, 382–395.
- Hebinger H.** 2013. Le colza. Paris : Editions France Agricole, « Agriproduction », 528p.
- Hell R, Rennenberg H.** 1998. The plant Sulphur cycle. In: Schnug E, ed. *Sulphur in agrosystems, First Edition*. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 135–174.
- Hesse H, Hoefgen R.** 2008. Metabolism of methionine in plants and phototropic bacteria. In: Hell R, Dahl C, Knaff D, Leustek T, eds. *Sulfur metabolism in phototrophic organisms*. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V., 93-110.
- Hibara K-I, Hosoki W, Hakoyama T, Ohmori Y, Fujiwara T, Itoh J-I, Nagato Y.** 2013. Abnormal Shoot in Youth, a homolog of molybdate transporter gene, regulates early shoot development in rice. *American Journal of Plant Sciences* **4**, 1–9.

Hirai MY, Fujiwara T, Awazuhara M, Kimura T, Noji M, Saito K. 2003. Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *The Plant Journal* **33**, 651–663.

Hirai MY, Yano M, Goodenowe DB, Kanaya S, Kimura T, Awazuhara M, Arita M, Fujiwara T, Saito K. 2004. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **101**, 10205–10210.

Hoefgen R, Nikiforova VJ. 2008. Metabolomics integrated with transcriptomics: assessing systems response to sulfur-deficiency stress. *Physiologia Plantarum* **132**, 190–198.

Honsel A, Kojima M, Haas R, Frank W, Sakakabara H, Herschbach C, Heinz Rennenberg. 2012. Sulphur limitation and early sulphur deficiency responses in poplar: significance of gene expression, metabolites, and plant hormones. *Journal of Experimental Botany* **63**, 1873–1893.

Howarth JR, Parmar S, Barraclough PB, Hawkesford MJ. 2009. A sulphur deficiency-induced gene, *sdi1*, involved in the utilization of stored sulphate pools under sulphur-limiting conditions has potential as a diagnostic indicator of sulphur nutritional status. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 200–209.

Huang C, Barker SJ, Langridge P, Smith FW, Graham RD. 2000. Zinc deficiency up-regulates expression of high-affinity phosphate transporter genes in both phosphate-sufficient and -deficient barley roots. *Plant Physiology* **124**, 415–422.

Hunashikatti MG, Channal HT, Sarangamath PA, Manjunathaiah HM, Hebsur NS. 2000. Effect of sulphur and molybdenum on the dry matter yield and uptake of S and Mo by cabbage. *Karnataka Journal Agriculture Science* **13**, 840–845.

- J -

Jackson GD. 2000. Effects of nitrogen and sulfur on canola yield and nutrient uptake. *Agronomy Journal* **92**, 644–649.

Jagadeeswaran G, Li YF, Sunkar R. 2014. Redox signaling mediates the expression of a sulfate-deprivation-inducible microRNA395 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **77**: 85–96.

Janzen HH, Bettany JR. 1984. Sulfur nutrition of rapeseed: I. Influence of fertilizer nitrogen and sulfur rates. *Soil Science Society of America Journal* **48**, 100–107.

Janzen HH, Bettany JR. 1987. The effect of temperature and water potential on sulfur oxidation in soils. *Soil Science*. **144**, 81-89.

Jones MB, Ruckman JE, Williams WA, Koenigs RL. 1980. Sulfur diagnostic criteria as affected by age and defoliation of subclover. *Agronomy Journal* **72**: 1043–1046

Justes E. 1993. Diagnostic de la nutrition azotée du blé, à partir de la teneur en nitrate de la base de la tige. Application au raisonnement de la fertilisation. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 231p.

- K -

- Kast D, Stalder M, Rügsegger A, Galli U, Brunold C.** 1995. Effect of NO₂ and nitrate on sulfate assimilation in maize. *Journal of Plant Physiology*. **147**, 9-14.
- Kataoka T, Hayashi N, Yamaya T, Takahashi H.** 2004a. Root-to-shoot transport of sulfate in *Arabidopsis*. Evidence for the role of *SULTR3:5* as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. *Plant Physiology* **136**, 4198–4204.
- Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H.** 2004b. Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 2693–2704.
- Kaur G, Chandna R, Pandey R, Abrol YP, Iqbal M, Ahmad A.** 2011. Sulfur starvation and restoration affect nitrate uptake and assimilation in rapeseed. *Protoplasma* **248**, 299–311.
- Kawashima CG, Matthewman CA, Huang S, Lee B-R, Yoshimoto N, Koprivova A, Rubio-Somoza I, Todesco M, Rathjen T, Saito K, et al.** 2011. Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis*. *Plant J* **66**, 863–876.
- Kawashima CG, Yoshimoto N, Maruyama-Nakashita A, Tsuchiya YN, Saito K, Takahashi H, Dalmay T.** 2009. Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *The Plant Journal* **57**, 313–321.
- Kim H, Hirai, MY, Hayashi H, Chino M, Naito S, Fujiwara T.** 1999. Role of O-acetyl-L-serine in the coordinated regulation of the expression of a soybean seed storage-protein gene by sulfur and nitrogen nutrition. *Planta*. **209**, 282–289.
- Komarnisky LA, Christopherson RJ, Basu TK.** 2003. Sulfur: its clinical and toxicologic aspects. *Nutrition* **19**: 54–61.
- Kopriva S, Koprivova A.** 2003. Sulphate assimilation: a pathway which likes to surprise. In: Abrol YP, Ahmad A, eds. *Sulphur in Plants, First Edition*. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V., 359–374.
- Kopriva S, Koprivova A.** 2004. Plant adenosine 5'phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1775–1783.
- Kopriva S, Mugford SG, Matthewman C, Koprivova A.** 2009. Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization. *Plant Cell Reports* **28**, 1769–1780.
- Kopriva S, Rennenberg H.** 2004. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1831–1842.
- Koralewska A, Buchner P, Stuiver CEE, Posthumus FS, Kopriva S, Hawkesford MJ, De Kok LJ.** 2009. Expression and activity of sulfate transporters and APS reductase in curly kale in response to sulfate deprivation and re-supply. *Journal of Plant Physiology* **166**, 168–179.
- Krapp A, David LC, Chardin C, Girin T, Marmagne A, Leprince AS, Chaillou S, Ferrario-Méry S, Meyer C, Daniel-Vedele F.** 2014. Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **65**, 789–798.

- L -

- Lambrix V, Reichelt M, Mitchell-Olds T, Kliebenstein DJ, Gershenzon J.** 2001. The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *The Plant Cell* **13**, 2793–2807.
- Lappartient AG, Vidmar J, Leustek T, Glass ADM, Touraine B.** 1999. Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *The Plant Journal* **18**, 89–95.
- Lee B-R, Jin YL, Avice J-C, Cliquet J-B, Ourry A, Kim T-H.** 2009. Increased proline loading to phloem and its effects on nitrogen uptake and assimilation in water-stressed white clover (*Trifolium repens*). *New Phytologist* **182**, 654–663.
- Lee B-R, Muneer S, Kim K-Y, Avice J-C, Ourry A, Kim T-H.** 2013. S-deficiency responsive accumulation of amino acids is mainly due to hydrolysis of the previously synthesized proteins - not to de novo synthesis in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum* **147**, 369–380.
- Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies J.** 2000. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **51**, 141-65.
- Leustek T, Saito K.** 1999. Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology* **120**, 637–643.
- Lewandowska M, Sirko A.** 2008. Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. *Acta Biochimica Polonica* **55**, 457–471.
- Liang G, Yang F, Yu D.** 2010. MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **62**, 1046–1057.
- Lindahl M, Kieselbach T.** 2009. Disulphide proteomes and interactions with thioredoxin on the track towards understanding redox regulation in chloroplasts and cyanobacteria. *Journal of Proteomics* **72**, 416–438.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T) (-Delta Delta C) method. *Methods* **25**, 402–408.
- Llamas A, Tejada-Jiménez M, Fernández E, Galván A.** 2011. Molybdenum metabolism in the alga *Chlamydomonas* stands at the crossroad of those in *Arabidopsis* and humans. *Metallomics as Integrated Biometal Science* **3**, 578–590.
- Lugan R, Niogret M-F, Kervazo L, Larher FR, Kopka J, Bouchereau A.** 2009. Metabolome and water status phenotyping of *Arabidopsis* under abiotic stress cues reveals new insight into *ESK1* function. *Plant, Cell and Environment* **32**, 95–108.
- Lugan R, Niogret M-F, Leport L, Guégan J-P, Larher FR, Savouré A, Kopka J, Bouchereau A.** 2010. Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte: Metabolomics of *Thellungiella* under osmotic stress. *The Plant Journal* **64**, 215–229.

- M -

- Maathuis FJM, Diatloff E.** 2013. Roles and functions of plant mineral nutrients. In: Maathuis FJM ed. *Plant mineral nutrients methods and protocols*. New York: Springer Science+Business Media LLC, 1-21.
- Maillard A, Diquélou S, Billard V, Laîné P, Garnica M, Prudent M, Garcia-Mina José-Maria, Yvien JC, Ourry A.** 2015. Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1-15.
- Malagoli M, Schiavon M, Wirtz M, Hell R, Pilon-Smits EAH, Trevisan S, Quaggiotti S.** 2012. Molybdate Affects Sulfate Acquisition in *Brassica juncea* Plants. In: LJD Kok, M Tausz, MJ Hawkesford, R Hoefgen, MT McManus, RM Norton, H Rennenberg, K Saito, E Schnug, L Tabe eds, *Sulfur Metabolism in Plants*. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 169–173.
- Malhi SS, Gan Y, Raney JP.** 2007. Yield, seed quality, and sulfur uptake of oilseed crops in response to sulfur fertilization. *Agronomy Journal* **99**, 570.
- Malhi SS, Schoenau JJ, Grant CA.** 2005. A review of sulphur fertilizer management for optimum yield and quality of canola in the Canadian Great Plains. *Canadian Journal of Plant Science* **85**, 297–307.
- Malvi UR.** 2011. Interaction of micronutrients with major nutrients with special reference to potassium. *Karnataka Journal Agriculture Science* **24**, 106–109.
- Maruyama-Nakashita A, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Yamaya T, Takahashi H.** 2003. Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiology* **132**, 597–605.
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Tohge T, Saito K, Takahashi H.** 2006. *Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *The Plant Cell* **18**, 3235–3251.
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Watanabe-Takahashi A, Yamaya T, Takahashi H.** 2004a. Induction of SULTR1;1 sulfate transporter in *Arabidopsis* roots involves protein phosphorylation/dephosphorylation circuit for transcriptional regulation. *Plant and Cell Physiology* **45**, 340–345.
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Yamaya T, Takahashi H.** 2004b. Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation. *Journal Experimental of Botany* **55**, 1843–1849.
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Montagu MV, Inze D.** 1998. Glutathione homeostasis in plants: implication for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* **49**, 649-667.
- Maynard D, Stewart J, Bettany J.** 1983. Use of plant analysis to predict sulfur deficiency in rapeseed (*Brassica napus* and *Brassica campestris*). *Canadian Journal of Soil Science* **63**, 387–396.
- McGrath SP, Zhao FJ.** 1995. A risk assessment of sulphur deficiency in cereals using soil and atmospheric deposition data. *Soil Use Manag* **11**, 110–114.

- McGrath SP, Zhao FJ.** 1996. Sulphur uptake, yield responses and the interactions between nitrogen and sulphur in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *The Journal of Agricultural Science* **126**, 53–62.
- McLaren RG, Cameron KC.** 2004. *Soil Science*, 2nd edn. Victoria: Oxford University Press.
- McNeill A, Eriksen J, Bergström L, Smith KA, Marstorp H, Kirchmann H, Nilsson I.** 2005. Nitrogen and sulphur management: challenges for organic sources in temperate agricultural systems. *Soil Use and Management* **21**, 82–93.
- Melsted SW, Motto HL, Peck TR.** 1969. Critical plant nutrient composition values useful in interpreting plant analysis data. *Agronomy Journal* **61**, 17–20.
- Mendel RR.** 2005. Molybdenum: biological activity and metabolism. *Dalton Transaction Cambridge England* **2003**, 3404–3409.
- Merrien A.** 1997. Note about sulphur fertilization of winter rapeseed. *Romanian Agricultural research* 7-8.
- Merrien A, Pouzet A.** 1988. Principaux facteurs limitant les rendements de colza d’hiver dans les conditions françaises physiologie et élaboration du rendement du colza d’hiver. *Cetiom*, 16–19.
- Migge A, Bork C, Hell R, Becker TW.** 2000. Negative regulation of nitrate reductase gene expression by glutamine or asparagine accumulating in leaves of sulfur-deprived tobacco. *Planta* **211**, 587–595.
- Miller AJ, Fan X, Shen Q, Smith SJ.** 2007. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany* **59**, 111–119.
- Mullineaux P, Rausch T.** 2005. Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis research* **86**, 459–474.

- N -

- Nacry P, Bouguyon E, Gojon A.** 2013. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil* **370**, 1–29.
- Nikiforova VJ, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R.** 2003. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides responses specificity. *The Plant Journal* **33**, 633–650.
- Nikiforova VJ, Gakiere B, Kempa S, Adamik M, Willmitzer L, Hesse H, Hoefgen R.** 2004. Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on Sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1861–1870.
- Nikiforova VJ, Kopka J, Tolstikov V, Fiehn O, Hopkins L, Hawkesford MJ, 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.

- O -

Oenema O, Postma R. 2003. Managing sulphur in agroecosystems. Abrol YP, Ahmad A eds. *Sulphur in Plants*. Kluwer Academic Publishers, 45–70.

Orlovius K. 2003. Fertilizing for high yield and quality: oilseed rape. *International Potash Institute Bulletin N°16*, 130 p.

Ourry A, Gonzalez B, Boucaud J. 1989. Osmoregulation and role of nitrate during regrowth after cutting of ryegrass (*Lolium perenne*). *Physiologia Plantarum* **76**, 177–182.

O’Sullivan JN, Ernest J. 2007. Nutrient deficiencies in lesser yam (*Dioscorea esculenta*) characterized using constant–water table sand culture. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **170**, 273–282.

- P -

Parmar S, Buchner P, Hawkesford MJ. 2007. Leaf developmental stage affects sulfate depletion and specific sulfate transporter expression during sulfur deprivation in *Brassica napus* L. *Plant Biology* **9**, 647–653.

Pasricha NS, Fox RL. 1993. Plant nutrient sulfur in the tropics and subtropics. *Advances in Agronomy* **50**, 209–269.

Pedersen CA, Knudsen L, Schnug E. 1998. Sulphur fertilisation. In: Schnug E, ed. *Sulphur in agrosystems, First Edition*. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 115–134.

Pilon M, Cohu CM, Ravet K, Abdel-Ghany SE, Gaymard F. 2009. Essential transition metal homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 347–357.

Pinkerton A. 1998. Critical sulfur concentrations in oilseed rape (*Brassica napus*) in relation to nitrogen supply and to plant age. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **38**, 511–522.

Prosser IM, Purves JV, Saker LR, Clarkson DT. 2001. Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *Journal of Experimental Botany* **52**, 113–121.

Puig S, Peñarrubia L. 2009. Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 299–306.

- R -

Rabe E. 1999. Altered nitrogen metabolism under environmental stress conditions. In: Pessaraki M ed. *Handbook of plant and crop stress, Second edition*. New York: Marcel Dekker Inc, 349–363.

Randall PJ. 2015. Diagnosis of Sulfur Status of Winged Bean [*Psophocarpus Tetragonolobus* (L.) Dc] by Plant Tissue Analysis. *Journal of Plant Nutrition* **38**, 212–223.

Randall PJ, Freney JR, Spencer K. 2003. Diagnosing sulfur deficiency in rice by grain analysis. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **65**, 211–219.

Randall PJ, Spencer K, Freney JR. 1981. Sulfur and nitrogen fertilizer effects on wheat. I. Concentrations of sulfur and nitrogen and the nitrogen to sulfur ratio in grain, in relation to the yield response. *Crop and Pasture Science* **32**, 203–212.

Rasmussen PE, Ramig RE, Rohde CR. 1977. Tissue analyses guidelines for diagnosing sulfur deficiency in white wheat. *Plant and Soil* **46**, 153–163.

Rathke GW, Behrens T, Diepenbrock W. 2006. Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **117**, 80-108.

Rausch T, Wachter A. 2005. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Science* **10**, 503–509.

Reussi N, Echeverría H, Rozas HS. 2011. Diagnosing sulfur deficiency in spring red wheat; plant analysis. *Journal of Plant Nutrition* **34**, 573–589.

Reuveny Z, Dougall DK, Trinity PM. 1980. Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**, 6670–6672.

Riley NG, Zhao FJ, McGrath SP. 2002. Leaching losses of sulphur from different forms of Sulphur fertilizers: a field lysimeter study. *Soil Use and Management* **18**, 120-126.

Rouached H, Berthomieu P, Kassis El E, Cathala N, Catherinot V, Labesse G, Davidian J-C, Fourcroy P. 2005. Structural and functional analysis of the C-terminal STAS (sulfatetransporter and anti-sigma antagonist) domain of the *Arabidopsis thaliana* sulfate transporter SULTR1.2. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 15976–15983.

Rouached H, Secco D, Arpat AB. 2009. Getting the most sulfate from soil: regulation of sulfate uptake transporters in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* **166**, 893–902.

- S -

Saito K. 2004. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiology* **136**, 2443–2450.

Sarda X, Diquelou S, Abdallah M, Nesi N, Cantat O, Le Gouee P, Avice JC, Ourry A. 2014. Assessment of sulphur deficiency in commercial oilseed rape crops from plant analysis. *Journal of Agricultural Science* **152**, 616-633.

Scaife A, Burns IG. 1986. The sulphate-S/total S ratio in plants as an index of their sulphur status. *Plant and Soil* **91**, 61–71.

Schachtman D, Liu W. 1999. Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends in Plant Science* **4**, 281–287.

- Scherer HW.** 2001. Sulphur in crop production. *European Journal Agronomy* **14**, 81–111.
- Scherer HW.** 2009. Sulfur in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **172**, 326–335.
- Schiavon M, Pittarello M, Pilon-Smits EAH, Wirtz M, Hell R, Malagoli M.** 2012. Selenate and molybdate alter sulfate transport and assimilation in *Brassica juncea* L. Czern.: Implications for phytoremediation. *Environmental and Experiment Botany* **75**, 41–51.
- Schjoerring JK, Bock J, Gammelvind L, Jensen CR, Mogensen VO.** 1995. Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant and Soil* **177**, 255–264.
- Schnug E.** 1989. Double low oilseed rape in West Germany: sulphur nutrition and levels. In: Production and protection of oilseed rape and other *Brassica* crops. *Aspects of Applied Biology* **23**, 67-82.
- Schnug E, Haneklaus S.** 1994. Diagnosis of crop sulphur status and application of X-ray fluorescence spectroscopy to sulphur determination in plant and soil materials. *Sulphur in Agriculture* **18**, 31-40.
- Schnug E, haneklaus S.** 1998. Diagnosis of sulphur nutrition. In: Schnug E, ed. *Sulphur in agrosystems, First Edition*. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 1–38.
- Schnug E, Haneklaus S, Murphy D.** 1993. Impact of sulphur fertilization on fertilizer nitrogen efficiency. *Sulphur in Agriculture* **17**, 8–12.
- Scott N, Anderson G.** 1978. Organic sulphur fractions in Scottish soils. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **27**, 358-366.
- Shinmachi F, Buchner P, Stroud JL, Parmar S, Zhao F-J, McGrath SP, Hawkesford MJ.** 2010. Influence of sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in wheat. *Plant Physiology* **153**, 327–336.
- Sinclair AG, Saunders WMH.** 1984. Sulphur. In: Cornforth IS, Sinclair AG, eds. *Fertiliser and lime recommendations for pastures and crops in New Zealand, Second Edition*. Wellington: Ministry of Agriculture and Fisheries, 15–17.
- Sorin E, Etienne P, Maillard A, Zamarreno AM, Garcia-Mina JM, Arkoun M, Jamois F, Cruz F, Yvin JC, Ourry A.** 2015. Effect of sulphur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: identification of a new early indicator. *Journal of Experimental Botany* 1-15.
- Spencer K, Freney JR.** 1980. Assessing the sulfur status of field-grown wheat by plant analysis. *Agronomy Journal* **72**, 469–472.
- Spencer K, Freney JR, Jones MB.** 1977. Diagnosis of sulphur deficiency in subterranean clover. *Sulphur in Agriculture* **1**, 12–15, 17.
- Stroud JL, Zhao FJ, Buchner P, Shinmachi F, McGrath SP, Abecassis J, Hawkesford MJ, Shewry PR.** 2010. Impacts of sulphur nutrition on selenium and molybdenum concentrations in wheat grain. *Journal of Cereal Science* **52**, 111–113.
- Studer R, Merrien A, Devineau J.** 1987. Données nouvelles sur l'absorption du soufre Par le colza d'hiver en campagne berrichonne : Rapport INRA de Châteauroux 8P.

Szulc W, Rutkowska B, Sosulski T, Szara E, Stepień W. 2014. Assessment of sulphur demand of crops under permanent fertilization experiment. *Plant Soil Environ* **60**,135–140.

- T -

Takahashi H, Kopriva S, Giordano M, Saito K, Hell R. 2011. Sulfur Assimilation in Photosynthetic Organisms: Molecular Functions and Regulations of Transporters and Assimilatory Enzymes. In: Merchant SS, Briggs WR, Ort D, eds. *Annual Review of Plant Biology*, **Volume 62**. Palo Alto: Annual Reviews, 157–184.

Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford MJ, Saito K. 2000. The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **23**, 171–182.

Tan Q, Zhang L, Grant J, Cooper P, Tegeder M. 2010. Increased Phloem Transport of S-Methylmethionine Positively Affects Sulfur and Nitrogen Metabolism and Seed Development in Pea Plants^{1,[W][OA]}. *Plant Physiology* **154**, 1886–1896.

Tausz M. 2001. The role of glutathione in plant response and adaptation to natural stress. In: Grill D, Tausz M, Kok LJD eds. *Significance of glutathione to plant adaptation to the environment*. New York: Kluwer Academic Publishers, 101–122.

Tejada-Jiménez M, Galván A, Fernández E. 2011. Algae and humans share a molybdate transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 6420–6425.

Tejada-Jiménez M, Llamas Á, Sanz-Luque E, Galván A, Fernández E. 2007. A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 20126–20130.

Tomatsu H, Takano J, Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Shibagaki N, Fujiwara T. 2007. An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 18807–18812.

- U -

U N. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilisation. *Journal of Japanese Botany* **7**, 389-452.

- V -

Vauclare P, Kopriva S, Fell D, Suter M, Sticher L, Ballmoos Von P, Krahenbuhl U, Camp Den RO, Brunold C. 2002. Flux control of sulphate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: adenosine 5'-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols. *The Plant Journal* **31**, 729–740.

Veen BW, Kleinendorst A. 1986. The role of nitrate in osmoregulation of Italian ryegrass. *Plant and Soil* **91**, 433–436.

- W -

Walker KC, Booth EJ. 2003. Sulphur nutrition and oilseed quality. In: Abrol YP, Ahmad A, eds. *Sulphur in Plants, First Edition*. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V., 323–339.

Walker KC, Booth EJ. 2001. Agricultural aspects of rape and other *Brassica* products. *European Journal of Lipid Science and Technology* **103**, 441–446.

Watkinson JH, Perrott KW. 1990 A new soil test for sulphate and mineralisable organic sulphur. In: New Zealand fertilizer manufacturers research association, conference. Auckland: *New Zealand Fertilizer Manufacturers Research Association*, 188–198.

Wirtz M, Hell R. 2006. Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. *Journal of Plant Physiology* **163**, 273–286.

Wittstock U, Halkier BA. 2002. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in Plant Science* **7**, 263–270.

- X -

Xu GH, Magen H, Tarchitzky J, Kafkafi U. 2000. Advances in chloride nutrition of plants. In: Sparks DL, ed. *Advances in Agronomy, Volume 68*. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 97–150.

- Y -

Yoshimoto N, Inoue E, Saito K, Yamaya T, Takahashi H. 2003. Phloem-Localizing Sulfate Transporter, Sultr1:3, Mediates Re-Distribution of Sulfur from Source to Sink Organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**, 1511–1517.

Yoshimoto N, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Saito K, Takahashi H. 2007. Posttranscriptional regulation of high-affinity sulfate transporters in *Arabidopsis* by sulfur nutrition. *Plant Physiology* **145**, 378–388.

- Z -

Zhao FJ, Bilborrow PE, Evans EJ, McGrath SP. 1997. Nitrogen to sulphur ratio in rapeseed and in rapeseed protein and its use in diagnosing sulphur deficiency. *Journal of Plant Nutrition* **20**, 549–558.

- Zhao F, Evans EJ, Bilsborrow PE, Syers JK.** 1993. Influence of sulphur and nitrogen on seed yield and quality of low glucosinolate oilseed rape (*Brassica napus* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **63**, 29–37.
- Zhao FJ, Hawkesford MJ, McGrath SP.** 1999. Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *Journal of Cereal Science* **30**, 1–17.
- Zhao FJ, Hawkesford MJ, Warrilow AGS, McGrath SP, Clarkson DT.** 1996. Responses of two wheat varieties to sulphur addition and diagnosis of sulphur deficiency. *Plant and Soil* **181**, 317–327.
- Zhao FJ, Salmon SE, Withers PJA, Monaghan JM, Evans EJ, Shewry PR, McGrath SP.** 1999. Variation in the breadmaking quality and rheological properties of wheat in relation to sulphur nutrition under field conditions. *Journal of Cereal Science* **30**, 19–31.
- Zhao FJ, Tausz M, De Kok LJ.** 2008. Role of sulfur for plant production in agricultural and natural ecosystems. In: Hell R, Dahl C, Knaff D, Leustek T, eds. *Sulfur metabolism in phototrophic organisms*. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V., 417-435.
- Zuber H, Poignavent G, Le Signor C, Aimé D, Vieren E, Tadla C, Lugan R, Belghazi M, Labas V, Santoni AL, Wipf D, Buitink J, Avice JC, Salon C, Gallardo K.** 2013. Legume adaptation to sulfur deficiency revealed by comparing nutrient allocation and seed traits in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **76**, 982–996.

Elise SORIN. 2016.

Identification d'indicateurs de la nutrition soufrée chez le colza (*Brassica napus* L.) : mécanismes physiologiques sous-jacents et validation en conditions de plein champ.

Thèse de Normandie Université

Ecole Doctorale Normandie, Biologie Intégrative, Santé, Environnement

UMR INRA-UCN 950 EVA (Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutrition N, C, S) – Centre Mondial d'Innovation

Résumé :

Dans le contexte actuel d'oligotrophisation des sols en soufre (S) et d'une gestion peu maîtrisée de la fertilisation soufrée, il paraît essentiel d'optimiser la nutrition soufrée des plantes cultivées afin d'ajuster les apports d'engrais soufrés aux besoins réels des cultures. Cet enjeu est d'autant plus important pour des cultures exigeantes en S, comme le colza, pour lesquelles une limitation en S conduit à des diminutions importantes du rendement et de qualité des produits récoltés. L'objectif était donc d'identifier des indicateurs précoces et fiables de la nutrition soufrée afin d'obtenir un diagnostic précis du statut soufré de la culture de colza et d'ajuster au mieux la fertilisation soufrée.

L'étude de la cinétique précise des réponses physiologiques du colza à une privation en S en conditions contrôlées a permis de mettre en évidence deux indicateurs de la nutrition soufrée : i) le ratio $([Cl^-]+[NO_3^-]+[PO_4^{3-}]):[SO_4^{2-}]$ ou indicateur de remobilisation, simplifié par la suite en ratio $([Cl^-]+[P]):[S]$, traduit la compensation osmotique requise par la remobilisation du sulfate lors de la phase précoce de privation en S et ii) le ratio $[Mo]:[S]$ ou indicateur d'absorption, dont la variation très précoce, révèle l'induction massive de l'expression des gènes codant les transporteurs racinaires *BnaSultr1.1* et *BnaSultr1.2* aboutissant à une augmentation rapide de l'absorption du molybdate lors d'une privation en S. Ces indicateurs ont été validés en conditions de plein champ sur une culture de colza soumise à différents régimes de fertilisations. Le caractère générique de ces indicateurs a été validé en conditions contrôlées chez le blé, le maïs, la tomate, le chou-fleur, le pois et *Medicago truncatula*. L'ensemble des résultats montrent que l'utilisation conjointe de ces deux indicateurs pourrait permettre un diagnostic précoce, fiable et spécifique du statut soufré de la plante et ainsi permettre de gérer au mieux la fertilisation soufrée selon les besoins réels des cultures.

Mots-clés : Plantes -- Nutrition, Engrais et amendements, Carence en soufre, Diagnostic foliaire, Plantes -- Potentiel osmotique, Plantes -- Teneur en chlore, Plantes -- Teneur en phosphore, Molybdène.

Elise SORIN. 2016.

Identification of sulfur nutrition indicators in oilseed rape (*Brassica napus* L.): underlying physiological mechanisms and validation under field conditions.

Abstract:

Because of soil S oligotrophization and uncontrolled management of S fertilization, it is essential to optimize the S nutrition of crop plants to adjust S fertilizer inputs to the real needs of crops. This issue is particularly important for S demanding crops, such as oilseed rape, in which S limitation led to significant decreases in seed yield quality. Therefore, the main objective was to identify early and reliable indicators of S nutrition in order to obtain an accurate diagnosis of the S status in oilseed rape crop in order to finely tune S fertilization.

The study of the precise kinetic physiological responses of oilseed rape to S deprivation under controlled conditions was used to identify two indicators of S nutrition: i) the $([Cl^-]+[NO_3^-]+[PO_4^{3-}]):[SO_4^{2-}]$ ratio or remobilization indicator, simplified thereafter as the $([Cl^-]+[P]):[S]$ ratio revealed the osmotic compensation required by sulfate remobilization during the early phase of S deprivation and ii) the $[Mo]:[S]$ ratio or uptake indicator, whose change, even earlier than the previous indicator, revealed the massive induction of genes expression encoding root transporters (*BnaSultr1.1* and *BnaSultr1.2*) and leading to a rapid increase of molybdate uptake during S deprivation. These indicators have been validated under field conditions for the oilseed rape crop grown on an S oligotrophe plot receiving various levels of fertilization. The genericity of these indicators was validated under controlled conditions in wheat, corn, tomato, cauliflower, pea and *Medicago truncatula*.

Overall, these results show that the combined use of these two indicators may allow early, reliable and specific diagnosis of the plant S status and could be used to optimize the management of S fertilization according to the real needs of the crop.

Keywords: Plants -- Nutrition, Fertilizers, Foliar Diagnosis, Plants – Osmotic potential, Molybdenum.