

COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE
UNIVERSITÉ DE LIÈGE – GEMBLoux AGRO-BIO TECH

La fluorescence chlorophyllienne
associée aux composés phénoliques des feuilles
pour évaluer le statut azoté de la biomasse de la
pomme de terre

Feriel BEN ABDALLAH

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en
sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteurs: Prof. Bernard Bodson & Dr Jean-Pierre Goffart

2020

Résumé

Interroger la plante pour en déterminer son statut azoté est la stratégie utilisée en cours de saison pour le raisonnement de la fertilisation azotée des cultures de plein champ.

L'établissement d'une méthode de référence permettant l'évaluation du statut azoté en culture de pommes de terre a nécessité d'établir, en première étape, la courbe critique de dilution de l'azote (N) en Belgique pour la variété Bintje et d'en déduire l'indice de nutrition azotée (INN). L'INN est l'indicateur de référence reconnu pour l'évaluation du statut azoté d'une culture en cours de saison. L'INN a permis de définir l'optimum azoté de la culture pour assurer la production et le maintien d'un couvert végétal optimal nécessaire à l'obtention du rendement maximum en tubercules. Cependant, cette méthode de référence est basée sur un échantillonnage intrusif et donc laborieux et consommateur de temps qui rend son application à l'échelle du champ difficile à mettre en œuvre. Dans ce cadre, des méthodes optiques rapides sont souvent utilisées en cours de saison culturale pour l'évaluation du statut azoté en culture de pommes de terre de plein champ.

Afin de remédier aux limitations des méthodes optiques usuellement utilisées en plein champ et qui reposent sur l'estimation de la teneur en chlorophylle des feuilles (limitations liées à la saturation des mesures, au retard ou au défaut de détection par rapport à l'entrée réelle en carence azotée et au manque de spécificité des mesures vis-à-vis de l'N), une nouvelle approche a été étudiée pour l'évaluation du statut azoté en culture de pommes de terre. Cette approche est basée sur la signature de la fluorescence chlorophyllienne (ChlF) pour l'estimation de la teneur en composés phénoliques des feuilles, plus spécifiquement les flavonoïdes.

Les potentialités des mesures de la ChlF des feuilles ont été évaluées par comparaison avec des mesures optiques sur le feuillage en cours de saison durant trois années (2012, 2013 et 2014) pour deux variétés de pommes de terre cultivées en Belgique (Bintje et Charlotte) et recevant des doses croissantes de fumure azotée.

Les résultats indiquent que les mesures de ChlF basées sur l'estimation des flavonoïdes comme indicateurs foliaires du statut azoté de la culture, et combinés à la teneur en chlorophylle des feuilles, sont les plus pertinentes pour l'évaluation du statut azoté comparativement aux mesures de transmittance ou de réflectance. Les potentialités des mesures de la ChlF mises en évidence pour l'évaluation du statut azoté en culture de pommes de terre sont i) la sensibilité de réponse tout particulièrement en couplant les indicateurs flavonoïdes aux indicateurs chlorophylle, ii) la précocité de détection de la déficience en N (liée à l'accumulation des flavonoïdes suite à une déficience en N), et iii) l'exactitude (justesse et répétabilité) des mesures des indicateurs combinés pour l'évaluation de teneur en N au niveau de la plante.

La principale limitation pointée au niveau de ce travail de recherche est la faible spécificité des indicateurs foliaires qui ne sont pas exclusivement reliés à la fourniture en N. Les indicateurs foliaires testés sont en effet sensibles à d'autres

facteurs externes tels que la variété, l'année d'expérimentation et la date de mesure. En travaillant avec les valeurs relatives des mesures par la prise en compte d'une fenêtre de référence (soit une fenêtre sans apport d'N, soit une fenêtre surfertilisée), la limitation liée à la spécificité des mesures est atténuée comparativement aux valeurs absolues.

Les mesures analytiques des feuilles de pommes de terre récoltées ont confirmé que la déficience en N induit l'accumulation des composés flavonoïdes foliaires et plus précisément de la sous-classe des flavonols. La teneur totale en flavonols mesurée pour Bintje, identifiée comme composée de la rutine, de la quercétine et du kaempférol-3-rutinoside, a été corrélée aux mesures de ChlF en relation avec le statut azoté de la culture. Cependant, l'identification et la quantification d'autres composés spécifiques de la sous-classe des flavonols dont l'accumulation est liée au statut azoté de la culture n'ont pas été possibles au niveau de ce travail de thèse, en particulier pour la variété Charlotte.

En conclusion, les mesures de ChlF liées à l'estimation de la teneur en flavonoïdes (en particulier la sous-classe des flavonols) combinés à la teneur en chlorophylle sont prometteuses pour l'évaluation en cours de saison du statut azoté de la culture de pommes de terre. En raison de la faible spécificité tant de la chlorophylle que des flavonoïdes pour l'évaluation du statut azoté, il est préconisé pour la mise en œuvre de ces indicateurs de travailler avec les valeurs relatives des mesures plutôt qu'avec leurs valeurs absolues.

Abstract

Taking into account the plant to determine its nitrogen (N) status is the used in-season strategy for the management of N fertilization of field crops.

The need of a reference method allowing the evaluation of the N status in potato crop was a prerequisite which required firstly, the establishment of the critical N dilution curve for Belgium with the cultivar Bintje and to deduce the Nitrogen Nutrition Index (NNI). The NNI is the recognized N reference indicator for the evaluation of in season crop N status. The NNI allowed defining the optimal crop N status required to ensure the production and maintenance of optimal plant canopy achieving higher tubers yield. However, due to the destructive and time-consuming plant sampling, its application on farm level is difficult to implement. In this context, quick optical methods are often preferred during growing season for the evaluation of the N status of field potato crops.

In order to overcome the limitations of the commonly used optical methods and which rely on the estimation of leaf chlorophyll content (limitations related to the measurements saturation, the delay or failure to detect N deficiency and the lack of specificity to N status), a novel approach has been studied in order to assess the potato crop N status. This approach is based on the signature of chlorophyll fluorescence (ChlF) and enables the estimation of phenolic compounds content in leaves, particularly flavonoids content.

The potentialities of the leaf ChlF signature were evaluated by comparing in season plant optical measurements during three years (2012, 2013 and 2014) for two potato cultivars grown in Belgium (Bintje and Charlotte) and receiving increasing N fertiliser rates.

The results indicate that ChlF measurements based on the estimation of leaf flavonoids content combined with leaf chlorophyll content are the most relevant indicators for the evaluation of N status compared with transmittance or reflectance measurements. The highlighted potentialities of ChlF measurements for the assessment of potato crop N status are i) the sensitivity of ChlF measurements particularly by combining flavonoids indicators with chlorophyll indicators, ii) the earliness of the diagnosis of N deficiency (related to flavonoids accumulation due to N deficiency), iii) and the accuracy (precision and repeatability) of measurements of the combined indicators for the evaluation of N content at the plant level.

The major limitation pointed out in this research is the low specificity of foliar indicators that are not exclusively related to N supply. The foliar indicators tested are indeed sensitive to other external factors, for instance, the cultivar, the year of experimentation and the date of measurement. Working with relative values of the measurements by taking into account a reference window plot within the field (either a window without N supply, or an over-fertilized window) reduces the limitation related to the specificity of the measurements comparatively to the absolute values.

The analytical measurements of collected potato leaves confirmed that N deficiency leads to the accumulation of leaf flavonoids compounds, more specifically flavonols subclass. The total flavonols content measured for Bintje and identified as composed of rutin, quercetin and kaempferol-3-rutinoside were correlated to ChlF measurements in relation to N status. However, the identification and the quantification of other specific compounds of flavonols subclass, which their accumulation is related to the crop N status, were not possible in this work particularly for the cultivar Charlotte.

In conclusion, the ChlF measurements related to the estimation of leaf flavonoids content (particularly flavonols subclass) combined with leaf chlorophyll content are promising for the evaluation of in season potato crop N status. Due to the low specificity of chlorophyll and flavonoids indicators for the assessment of N status, it is recommended, for the implementation of these indicators, to work with the relative values of these measurements rather than the absolute values.

Remerciements

Et voici venu finalement le temps des remerciements! J'ai bien dû y penser une centaine de fois durant ma thèse. J'avais hâte d'en arriver à ce moment-là et bien finalement, c'est une tâche bien plus difficile à réaliser qu'on ne le croit...

De nombreuses personnes ont contribué directement ou indirectement à ce travail de longue haleine. Je tiens donc à remercier par cette liste non exhaustive et non hiérarchisée :

Mes promoteurs :

Mon promoteur et ancien chef au sein du Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W), Mr. Jean Pierre Goffart, Directeur général adjoint, pour sa grande disponibilité, ses nombreux conseils, ses relectures qui m'ont semblés interminables lors des dernières étapes de la thèse, sa confiance et son soutien tout au long de cette thèse et également de m'avoir toujours impliquée dans les différents projets au sein du CRA-W.

Mon promoteur au sein de Gembloux Agro-BioTech (GxABT) Université de Liège (ULiège), le Professeur Bernard Bodson, responsable de l'unité « Phytotechnie tempérée » pour son travail de supervision, ses réorientations et ses conseils.

Les membres de mon jury de thèse:

Monsieur le professeur Patrick Dujardin, responsable de l'unité « Biologie végétale » de GxABT-ULiège, d'avoir accepté la présidence du jury de thèse et pour ses remarques et commentaires très utiles lors des réunions du comité de thèse.

Monsieur Jean-Pierre Destain, Directeur général honoraire du CRA-W qui a suivi ce travail de thèse depuis le début et qui malgré son départ à la retraite le suit encore.

Les professeurs Benjamin Dumont de l'unité « Phytotechnie tempérée », et Benoit Mercatoris de l'unité « Biosystems Dynamics and Exchanges » de GxABT-ULiège d'avoir accepté de prendre le train en marche et qui ont apporté la touche nécessaire à l'amélioration de ce travail.

Monsieur le professeur Xavier Draye (Earth and Life Institute, Université Catholique de Louvain) pour avoir accepté de faire partie du comité de suivi du projet duquel a démarré cette thèse puis de mon jury de thèse, pour ses commentaires utiles et pertinents sur mon travail ainsi que pour la discussion intéressante lors de la défense privée.

Les équipes de recherches que j'ai eu l'occasion de rencontrer durant ce travail de thèse:

L'équipe de recherche au sein du Centre de recherche et de développement Agriculture et Agroalimentaire Canada (Saint-Jean-sur-Richelieu, Québec), en particulier Monsieur Nicolas Tremblay, mon superviseur de stage, Edith Fallon et Yassine Bouroubi; ce séjour s'est avéré une expérience très enrichissante tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Nicole Brassard de m'avoir hébergée lors de ce séjour au Québec confirmant ainsi l'hospitalité et l'accueil légendaires des Québécois.

Monsieur Zoran Cerovic (chargé de recherche au CNRS en France, affecté au Laboratoire Écologie Systématique et Évolution), pour ses explications sur la fluorescence et les échanges de courriel qui m'ont bien aidé à éclaircir certains points flous au début de la thèse.

L'équipe de recherche au sein de la start-up Force-A (Université Paris-Sud, Paris, Orsay, France), je pense notamment à Laurent Florins, Marc Pastor et François Péan pour les échanges constructifs concernant les outils de fluorescence.

Mes supérieures hiérarchiques au sein du CRA-W:

Madame Fabienne Rabier, Directrice scientifique a.i. de notre nouvelle unité « Productions végétales », de m'avoir permis de me concentrer sur l'aboutissement de la thèse avant d'entamer les nouveaux défis dans le cadre la nouvelle structure du CRA-W.

Monsieur Yves Schenkel, Chef du département « Productions agricoles », pour son implication et ses conseils.

Mes collègues du CRA-W :

Madame Viviane Planchon, Directrice scientifique de l'unité « Agriculture, territoire et intégration technologique », de sa gentillesse et de son soutien à mes débuts dans la recherche et pour son aide précieuse qui m'a permis de définir les variables en vue d'une bonne analyse statistique.

Madame Elena Pitchugina, responsable des analyses statistiques au sein de la cellule d'appui à Requasud qui m'a aidé et apporté de nombreux éclairages pour l'analyse statistique des données, une discipline pour laquelle il faut bien le reconnaître, j'étais peu familière.

Monsieur Jean Michel Romnée, Maître de recherches au sein de l'unité « Valorisation des produits, de la biomasse et du bois », pour les mesures analytiques HPLC, sans son aide une partie de ce travail de thèse n'aurait pu être réalisé.

Monsieur Vincent Baeten, Directeur scientifique de l'unité « Qualité et authentification des produits » et ses collègues Nicolas Crasset et Olivier Minet pour les analyses de l'azote par spectrométrie dans le proche infrarouge.

Yannick Curnel, Attaché scientifique au sein de l'unité « Agriculture, territoire et intégration technologique », qui par sa relecture minutieuse a contribué à ce travail de thèse.

Mes collègues du Petermann:

Les « patatiers » : Luc Thomas, William Philippe, Gregory Cloux, Daniel Delooz, Rudy Chanet et sans oublier évidemment ceux qui nous ont quittés pour une retraite bien méritée : Daniel Chaboteaux et Jacques Detal dont l'aide a été indispensable à la réalisation de la partie expérimentale de cette thèse et qu'ils m'ont aidé à mener à bien.

Les « filles du Labo » Brigitte Maloteaux et Véronique Dethier et leurs collègues Frédérique Tasiaux et Véronique Reuter pour les analyses de l'azote minéral du sol.

Les collègues de la FIWAP qui par une carte, une bonne adresse ou par un avis au niveau du FIWAP-info ont contribué à ce travail.

Mes premiers collègues directs de l'ancienne U5 : Claire, Morgan, Guillaume et Laetitia, pour les échanges, les conseils et les encouragements.

Carmen qui par un café, des petits biscuits, ou par un arrosage in extremis de la seule plante survivante du bureau rend le quotidien plus agréable.

Ma voisine de bureau Sophie, la nouvelle thésarde du bâtiment, pour son aide pour l'aspect administratif de la thèse.

Béa qui est en retraite maintenant et qui a contribué à la recherche en pommes de terre grâce à ces chutes de laines rouges accrochées soigneusement sur les folioles des plantes au champ (je fais d'ailleurs un petit clin d'œil au patatiers qui se souviennent encore de cette manipulation).

Ma collègue et amie Donatienne Arlotti pour son aide pour la mise en forme de la thèse, pour la résolution des nombreux problèmes informatiques, pour son écoute et pour ses petites attentions (équilibrage de la roue énergétique, crème hydratante made in Home, une bonne mousse au chocolat...).

Bruno, Briec, Jean-Luc, Dirk, Philippe, Omer, Grégory, Rodrigo, Damien, Bernard, Christian, Fabienne, Jean-Pol, Joost, Johan, les deux Marie France, Daniel, les membres du CIM, et les nouvelles venues de l'ASBL Fourrages mieux (qui vont déjà déménager !) qui par un sourire, par un sifflement aigu (il se reconnaîtra), par les bons moments passés ensemble lors des pauses café permettent de maintenir la bonne humeur au sein du bâtiment.

Je n'oublie pas les anciennes, celles qui étaient là à mes débuts et avec qui j'ai partagé le bureau Camille Amoris et Virginie Poulet par les échanges scientifiques ou non et surtout par leur encouragement au démarrage de ma thèse.

Je ne peux clôturer ce chapitre des collègues sans mentionner les membres du « Girl Power du Petermann », qui sont toujours partantes pour l'organisation d'une petite marche sur le temps de midi (encore à l'étape prévisionnelle, c'est l'intention qui compte!), une sortie ciné, ou un petit souper.

Les mains derrière ce travail de thèse :

Les stagiaires qui ont contribué à ce travail de thèse par des mesures aux champs, des prélèvements de plantes ou par des analyses analytiques plus poussées ; je pense notamment à Adrien Docks (Université Catholique de Louvain), Maria Teresa Fleitas (Université d'Almería, Espagne), Aurore Vaudatin (VetAgro-sup, Clermont-Ferrand), Marco Tempesta (Université libre de Bolzano/Bozen, Italie) et Jonathan Dessy (École industrielle et commerciale de la Ville de Namur).

J'en arrive au chapitre plus personnel :

Toutes les personnes qui m'ont permis d'oublier momentanément le travail dans des soirées, repas, sorties vélo ou autres; je pense notamment à Fred, Nath, Maria, Charles, Julie et Erika.

Mon amie Amina qui malgré la distance reste à mes côtés et m'encourage.

Ma famille bien loin de moi:

Ma maman, sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui et à qui je dois tout, pour son amour et son soutien inconditionnel.

Mon frère pour son aide dans la réalisation du design des posters et de certaines illustrations de la thèse.

Ma sœur, mes neveux, ma nièce, mes tantes, mes oncles et tous les cousins et cousines... qui me soutiennent et qui ont hâte de me voir finir cette thèse entamée depuis si longtemps...

Tous ceux qui ne sont plus là : mon papa, mon pilier, et mes grands-parents.

Pauline et Thomas pour les petites bulles d'oxygène octroyées les weekends: footing, shopping, jeux de société ou « pitti » films...

Mes deux enfants : Sofia et Sacha, pour les cernes sous les yeux, les abonnements aux urgences de ces derniers mois, mais qui par un sourire, un baiser ou un petit mot mal prononcé parviennent à me faire oublier tous les tracas.

Henri qui malgré son emploi du temps chargé a su m'octroyer une petite tranche (un samedi par mois☺) pour la garde des enfants afin que je puisse avancer sur la thèse et qui m'a surtout supporté durant cette dernière étape de rédaction qui n'a pas toujours été des plus agréables.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Remerciements.....	v
Table des matières	ix
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xiii
Liste des abréviations.....	xv
Chapitre 1. Introduction et objectifs de la thèse.....	1
1. Contexte de la recherche	1
2. Nutrition azotée en culture de pomme de terre	1
3. Raisonnement de la fertilisation azotée.....	5
3.1. Approche liée au sol.....	5
3.2. Approche liée au végétal.....	6
4. Fluorescence chlorophyllienne et composés phénoliques	11
5. Structure et objectifs de la thèse.....	14
Chapitre 2. La fluorescence chlorophyllienne pour l'évaluation du statut azoté des cultures.....	27
1. Utilisation de la fluorescence chlorophyllienne pour l'évaluation du statut azoté des cultures (synthèse bibliographique)	29
1.1. Introduction.....	30
1.2. Méthodologie.....	33
1.3. Conclusions.....	42
2. Actualisation sur les avancées dans le domaine de la fluorescence chlorophyllienne.	49
3. Lien avec le chapitre suivant.....	56

Chapitre 3. La courbe critique de dilution de l'azote et l'indice de nutrition azotée 61

1. Establishing the Nitrogen Dilution Curve for Potato Cultivar Bintje in Belgium..... 63

1.1. Introduction..... 64

1.2. Material and methods 65

1.3. Results and discussion 70

1.4. Conclusion 85

2. Lien avec le chapitre suivant..... 89

Chapitre 4. Les flavonoïdes comme indicateurs foliaires du statut azoté de la culture de pomme de terre 95

1. Comparison of optical indicators for potato crop nitrogen status assessment including novel approaches based on leaf fluorescence and flavonoid content... 97

1.1. Introduction..... 98

1.2. Material and methods..... 99

1.3. Results and discussion 108

1.4. Conclusion 130

1.5. Annexe 1 136

2. Lien avec le chapitre suivant..... 141

Chapitre 5. Les composés phénoliques en relation avec la concentration en azote des feuilles..... 145

1. Effects of nitrogen fertilization on the accumulation of phenolic compounds on potato leaves 147

1.1. Introduction..... 147

1.2. Material and methods..... 150

1.3. Results and discussion 154

1.4. Conclusion 163

1.5. Annex 2..... 169

2. Lien avec le chapitre précédent..... 170

Chapitre 6. Synthèse générale, conclusion et perspectives..... 173

1. Synthèse générale 173

2. Conclusion..... 178

3. Perspectives 180

Liste des figures

Figure 1. Évolution de l'absorption de l'azote par la pomme de terre en fonction du stade de développement de la culture.....	3
Figure 2. Diagramme de la stratégie de recherche de la thèse.....	15
Figure 3. Représentation schématique du comportement du rayonnement solaire incident impactant la surface d'une feuille de dicotylédone dans le spectre visible .	31
Figure 4. Diagramme d'énergie représentant l'état fondamental et les différents états excités pour la chlorophylle <i>a</i> (en solution). Spectre d'absorption de la chlorophylle <i>a</i> et bandes d'absorption (à droite) correspondant approximativement aux niveaux électroniques du diagramme).	34
Figure 5. Paramètres de la fluorescence chlorophyllienne variable..	35
Figure 6. Évolution de l'intensité des fluorescences dans le rouge (RF) et dans le proche infrarouge (FRF) de la chlorophylle <i>a</i> isolée en fonction de la concentration de la solution en chlorophylle <i>a</i>	36
Figure 7. Spectres d'émission (a) et de détection (d, e) de la fluorescence chlorophyllienne (en rouge) et spectres de réabsorption de la chlorophylle (b, c en noir) émis <i>in vivo</i> au niveau d'une feuille bifaciale.	37
Figure 8. Principe de mesure de la fluorescence chlorophyllienne induite suite à une excitation UV et une excitation rouge.	39
Figure 9. Changes of nitrogen concentration in total biomass (W, expressed in % of dry matter) with time for potato cultivar Bintje under different N rates (kg N ha ⁻¹) at the site Gembloux in 1998.....	77
Figure 10. Critical nitrogen (N _c) concentration data points used to define the critical N dilution curve of potato for cultivar Bintje in Belgium.	79
Figure 11. Comparison of different critical nitrogen curves for potato.....	80
Figure 12. Validation of the Belgian critical N curve using data from potato cultivars Bintje and Charlotte under limiting and non limiting N growth conditions.....	82
Figure 13. Nitrogen Nutrition Index (NNI) of three sampling dates for increasing N rates (kg N ha ⁻¹) at the site of Gembloux in 2014 for cultivar Bintje.....	82
Figure 14. Relationship between relative yield (RY) measured at harvest and nitrogen nutrition index (NNI) for cultivar Bintje measured across all the sampling dates (a), across the period of 20 and 55 DAE (b) and for the last sampling date (c). The <i>vertical bars</i> indicate the joint point for each curve, and the <i>horizontal bars</i> indicate the plateau of the curve.....	84
Figure 15. a) Total monthly rainfall (l m ⁻²) and mean monthly temperature (C°) data collected from the official meteorological station of the Belgian Royal Meteorological Institute (IRM) in Gembloux-Ernage (near the location of the trials), and (b) mean soil moisture tension (kPa) recorded from soil tensiometer probes (Watermark probes, Irrrometer Company, California) at a depth of 25 cm from the top of the ridge. Data collected for 2012, 2013 and 2014 trials.	109

Figure 16. Tuber yield response to increasing N fertiliser rates in potato crop trials on loam soil in the Gembloux area for two potato cultivars, Bintje and Charlotte (2012, 2013 and 2014 data).....	110
Figure 17. Nitrogen Nutrition Index (NNI) measured across the sampling period (between 20 and 55 DAE) for increasing N rates (kg N ha ⁻¹) at the site of Gembloux in 2012, 2013 and 2014 for Bintje and Charlotte cultivars.....	112
Figure 18. Évolution des indicateurs flavonoïdes (FLV) mesurés par le Dualex en fonction des jours après émergence de la culture pour des niveaux croissants d'azote appliqué -Variété Bintje en 2012 (A) et 2013 (B) et variété Charlotte en 2012 (C) et 2013(D).....	137
Figure 19. Évolution des indicateurs combinant flavonoïdes et chlorophylle (NBI-R) mesurés par le Multiplex en fonction des jours après émergence de la culture pour des niveaux croissants d'azote appliqué -Variété Bintje en 2012 (A) et 2013 (B) et variété Charlotte en 2012 (C) et 2013(D).....	138
Figure 20. Évolution des indicateurs flavonoïdes (mesurés par le Dualex) combinés à la chlorophylle (mesurée par le chlorophyllomètre Hydro N-tester) en fonction des jours après émergence de la culture pour des niveaux croissants d'azote appliqué -Variété Bintje en 2012 (A) et 2013 (B) et variété Charlotte en 2012 (C) et 2013(D).....	139
Figure 21. Évolution des indicateurs flavonoïdes (mesurés par le Multiplex) combinés à la chlorophylle (mesurée par le chlorophyllomètre Hydro N-tester) en fonction des jours après émergence de la culture pour des niveaux croissants d'azote appliqué -Variété Bintje en 2012 (A) et 2013 (B) et variété Charlotte en 2012 (C) et 2013(D).....	140
Figure 22. Mean values of leaf N content (% of Dry Weight) average for each year over cultivars and sampling dates and measured based on the Dumas method as a function of nitrogen rates.....	154
Figure 23. Mean values of leaf total phenolics content (average for each year over cultivars and sampling dates) measured using Folin-Ciocalteu method.....	155
Figure 24. Response of the DR_375 nm measured by UHPLC-DAD on nitrogen rates studied per date and per cultivar for 2012 (A) and 2013 (B) trials.	158

Liste des tableaux

Table 1. Soil and crop characteristics of the experimental sites in Belgium used for the calibration and the validation (*) of the critical N (Nc) curves.	67
Table 2. Total biomass production for different potato trials conducted in Belgium with increasing N-fertilizer rates from 1997 to 2014 of cultivar Bintje or Charlotte.	71
Table 3. Critical nitrogen concentration data points selected for the calibration of the Belgian critical nitrogen dilution curve for cultivar Bintje.	78
Table 4. Crop and soil characteristics of the three-year trials conducted at the Walloon Agriculture Research Center in Gembloux, Belgium.	100
Table 5. Measurement dates for optical sensors used in this study.	101
Table 6. Description of the N-indices provided by the different optical sensors used in this study.	104
Table 7. Plant sampling dates in 2012, 2013 and 2014 trials.	106
Table 8. The effect of N fertiliser rates on nitrate content (mg kg ⁻¹ fresh weight, FW) and dry matter of tubers (%).	111
Table 9. Reading responses of different optical indices (see description in Table 2) to increasing N fertiliser rates including the sampling period (both 2012 and 2013 trials) and potato cultivars (Bintje and Charlotte) as a whole.	114
Table 10. Reading responses of different optical indices (see description in Table 6) to N fertiliser rates for each cultivar and for each sampling date in 2012 and 2013 trials.	116
Table 11. Reading responses of flavonoid and/or chlorophyll indices (see description in Table 2) to increasing N fertiliser rates across the sampling period for the 2014 trial and for both potato cultivars (Bintje and Charlotte).	119
Table 12. Reading responses of flavonoids and/or chlorophyll indices (see description in Table 2) to N fertiliser rates for each cultivar and for each sampling date in the 2014 trial.	120
Table 13. Precision of the indices evaluated in the 2012 and 2013 trials on the basis of the Pearson correlation coefficient obtained between the index and the N content.	121
Table 14. Coefficients of variation for the absolute indices obtained between the four repetitions (all nitrogen fertilisation levels)	126
Table 15. Comparison of the absolute indices versus the relative indices.	128
Tableau 16. Corrélacion entre les indices optiques et les mesures de référence du statut azoté de la culture.	136
Table 17. Sampling dates for optical and analytical measurements.	150
Table 18. The gradient profile of the mobile phase.	152
Table 19. Characteristics of the purchased phenolic compounds and their chromatographic parameters (retention time and UV spectra) determined by UHPLC-DAD.	153

Table 20. Effect of nitrogen rates on leaf phenolic content measured by UHPLC method for each experimental year.....	156
Table 21. The effect of N fertiliser rates on optical flavonoids indices measured by the Dualex (Force-A, Orsay, France).	159
Table 22. Pearson correlation coefficients obtained between leaf N content and both analytical and optical parameters of leaf phenolics compounds for potato cultivar Bintje and Charlotte across the two experimental years.....	161
Table 23. Pearson correlation coefficients obtained between optical and analytical flavonoids measurements.	162
Table 24. Tested N factors on the optical flavonoids indices average on cultivars and sampling dates and studied for each experimental year.	169

Liste des abréviations

ChlF : Fluorescence chlorophyllienne

Fs : Fluorescence stationnaire

GAI: Green Area Index

GNDVI: Green Normalized Difference Vegetation Index

INN: Indice de nutrition azotée

IV : Indices de végétation

JAE : Jours Après Émergence

LAI: Leaf Area Index

NDVI: Normalized Difference Vegetation Index

N: Azote

OSAVI: Optimized Soil-Adjusted Vegetation Index

PIabs : Indice de performance pour l'activité photochimique

PIR : Proche infrarouge

PItot : Indice de performance totale pour l'activité photochimique

PSI : Photosystème I

PSII : Photosystème II

R: Rouge

SAVI: Soil-Adjusted Vegetation Index

UV:Ultra-Violet

Chapitre 1

Introduction et objectifs de la thèse

Chapitre 1. Introduction et objectifs de la thèse

1. *Contexte de la recherche*

La pomme de terre se classe au quatrième rang mondial des cultures vivrières après le riz, le blé et le maïs avec près de 377 millions de tonnes produites sur une superficie de 19 millions d'hectares en 2016 (FAO, 2016). L'Europe est le deuxième producteur mondial de pommes de terre, après l'Asie. Cinq pays producteurs du nord-ouest de l'Europe (Belgique, Allemagne, France, Pays-Bas, Grande-Bretagne) membres du NEPG (*North-western European Potato Growers*) assurent plus de 60 % de la production européenne (source Eurostat) (Lebrun et al., 2018). Au niveau belge, la production de pomme de terre est devenue un élément majeur de l'activité agricole et agroalimentaire. La superficie allouée aux pommes de terre en 2017 était de 95.283 ha pour la Belgique (STATBEL, 2017), et est en progression constante ces 5 dernières années selon le NEPG, en se rapprochant des 100.000 ha. Pour la région wallonne, la superficie consacrée s'élève à 40.653 ha dont 266 ha de pommes de terre hâtives, 846 ha de plants et 39.451 ha de pommes de terre de conservation (STATBEL, 2017). Avec une production de pommes de terre de consommation de 5,11 millions de tonnes, la production belge a enregistré un nouveau record en 2017 (Lebrun et al., 2018). Selon les dernières statistiques, la Belgique reste le premier exportateur de produits surgelés à base de pommes de terre avec 2,2 millions de tonnes de produits transformés en 2017 (Belgapom, 2017).

Compte tenu de son rendement élevé et de sa grande valeur nutritive, la pomme de terre est une culture vitale au niveau mondial pour la sécurité alimentaire et une alternative pour répondre au défi de nourrir près de 10 milliards d'habitants sur terre en 2050 (Devaux et al., 2019). Au cours des quatre dernières décennies, le doublement de la production agroalimentaire dans le monde a été associé à une utilisation accrue d'un facteur 7 des engrais azotés (Hirel et al., 2007). Avec la croissance démographique, le défi pour les prochaines décennies sera de répondre aux besoins de la population en développant une agriculture très productive, tout en préservant la qualité de l'environnement. La disponibilité en azote est le principal facteur limitant la productivité des cultures (Maheswari et al., 2017).

2. *Nutrition azotée en culture de pomme de terre*

Aspect cultural

La culture de pomme de terre a des besoins élevés en azote (4 à 6 kg N/t de plantes fraîches entières, soit environ 250 kg N/ha pour un objectif de rendement de 50 t/ha) (Olivier et al., 2006). La nutrition azotée est un des points clé de la réussite en culture de pomme de terre. Une nutrition azotée optimale de la plante durant toute la

période de la culture mène à l'obtention d'un niveau de rendement physique optimum de tubercules dans le calibre recherché et de bonne qualité culinaire ou technologique (Goffart et al., 2002). L'excès en azote induit souvent un retard d'initiation de la tubérisation et l'allongement du cycle cultural induisant un développement et une croissance excessifs de la partie aérienne au détriment des tubercules. Une telle situation peut provoquer davantage de risque d'apparition du mildiou de pomme de terre ou encore des problèmes de défanage en fin de saison de la culture. En fin de culture, d'autres risques importants sur les tubercules sont induits par l'excès d'azote: le retard de maturation, des teneurs en matières sèches trop faibles et des teneurs en sucres réducteurs et en nitrates trop élevées à la récolte (Goffart et al., 2002).

Aspect environnemental

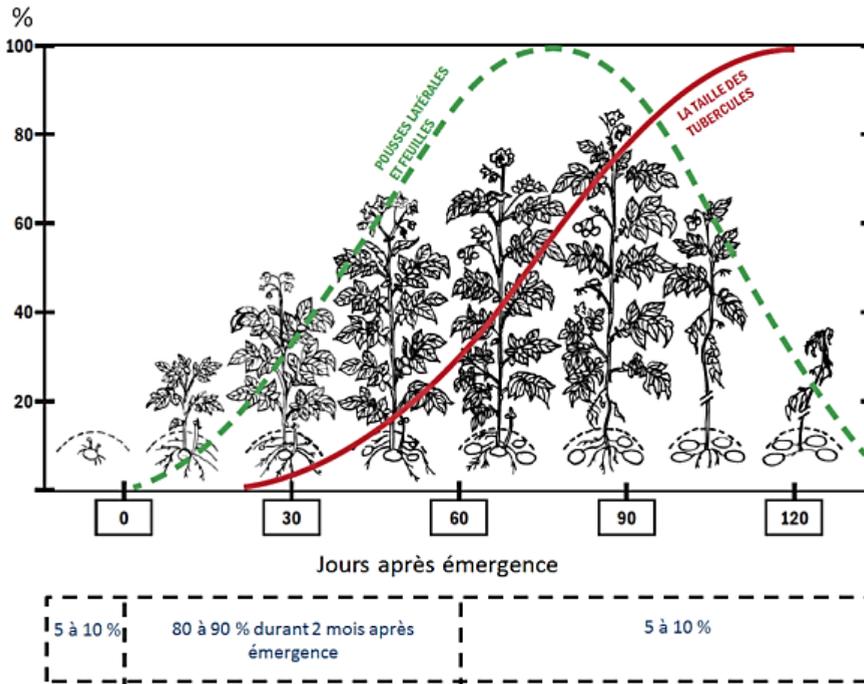
Les apports trop élevés d'azote en pommes de terre par rapport aux besoins de la culture sont à hauts risques pour l'environnement. Les risques portent d'abord sur les pertes potentielles de nitrate (NO_3^-), par lessivage hors de la zone de développement racinaire ou par ruissellement, qui à terme contribuent à l'enrichissement en nitrate des eaux souterraines ou de surfaces du bassin hydrographique concerné (Goffart et al., 2002). Les risques environnementaux concernent également l'augmentation de la production de l'oxyde nitreux ou protoxyde d'azote (N_2O) issu de la dénitrification de l'azote du sol. Ce composé étant un puissant gaz à effet de serre qui intervient dans le réchauffement climatique de la planète (Mozier et al., 2004). Des normes de protection de l'environnement (eau et air) ont été mises en place dans le cadre des différentes directives européennes, dont la directive Nitrate (91/676/EC) ayant mené à la mise en oeuvre du PGDA (Programme de Gestion Durable de l'Azote en agriculture) en Wallonie basé sur le système des mesures APL (azote potentiellement lessivable) dans le profil du sol en automne (Vandenberghé et al., 2013).

Aspect économique

Outre l'aspect environnemental, les fertilisants azotés représentent une part relative de plus en plus importante du prix de revient de la culture, particulièrement depuis la crise économique de 2008. L'augmentation des prix des engrais azotés est liée principalement à la hausse du prix du gaz naturel (matière première de base dans la synthèse des engrais azotés) et à la hausse de la demande mondiale.

Dynamique d'absorption et efficacité d'utilisation de l'azote

Les besoins en azote d'une plante de pomme de terre sont très limités entre la plantation et l'émergence (Figure 1) (Goffart et al., 2002). Durant les deux mois suivant l'émergence, la culture absorbe l'essentiel de l'azote (80 à 90 %) pour la formation de la masse foliaire et des tiges (Westermann et al., 1985). Durant cette période et particulièrement de la quatrième à la sixième semaine après l'émergence une fertilisation azotée excessive ralentit ou réduit l'initiation et la formation des tubercules.



Évolution de l'absorption de l'azote par la culture (% de la quantité totale absorbée)

Figure 1. Évolution de l'absorption de l'azote par la pomme de terre en fonction du stade de développement de la culture exprimé en jours après émergence (adaptée à partir de Hack et al., 1993 ; Goffart et al., 2002).

Le coefficient d'utilisation de l'azote (CUA) pour la culture de pomme de terre est de 50% (Vos, 2009) et même de l'ordre de 35% si l'on ne prend en compte que l'azote exporté par les tubercules (le solde en azote étant contenu dans le feuillage). Ce coefficient est inférieur à celui des autres plantes. A titre comparatif, les CUA pour les céréales et les betteraves sucrières varient généralement de 70% à 90% (Goffart et al., 2002). En culture de pomme de terre, le cycle de développement court de la culture (environ, entre 90 et 140 jours), la faible profondeur d'enracinement, la faible densité de racines et la période de prélèvement intense de l'azote relativement brève expliquent la faible efficacité d'utilisation de l'azote.

Globalement, en tenant en compte de ces facteurs, les disponibilités en azote doivent être suffisantes tout au long de la croissance végétative pour assurer la production et le maintien d'un couvert végétal optimal sans porter préjudice à la formation des tubercules (Westermann et al., 1985). Cette notion des besoins en azote de la culture qui permet le développement du feuillage tout en tenant compte du rendement en tubercules est la base du concept de statut azoté optimal.

Statut azoté optimal

La notion du statut azoté optimal en culture de pommes de terre ne se restreint pas seulement à la définition de la production d'un objectif de rendement donné, ou bien aux prélèvements de l'azote par la plante. Cette notion plus large englobe la relation de l'accumulation de l'azote par la culture et l'élaboration de sa biomasse tout en tenant compte des objectifs de production de la parcelle. À l'échelle de la culture, Lemaire et al. (1984) ont étudié la relation entre l'évolution de la biomasse aérienne et sa teneur en azote qui a conduit à la définition de la courbe critique de dilution de l'azote et qui correspond à la teneur minimale en azote requise pour atteindre une biomasse aérienne maximale. Le phénomène de dilution de l'azote dans la plante entière traduit la diminution de la teneur en azote au fur et à mesure de la croissance suite à la redistribution de l'azote dans le couvert végétal. Étant donné que ce phénomène est également observé au niveau des tubercules, il convient donc de définir une courbe critique de dilution de l'azote pour la culture de pomme de terre qui prend en compte la plante entière dans la relation de la biomasse avec sa teneur en azote. Le concept de courbe critique de dilution de l'azote développé pour les graminées fourragères (Lemaire et al., 1984) a donc été appliqué à la culture de pomme de terre. Pour cette dernière, des courbes ont été établies pour différentes variétés et dans des conditions pédoclimatiques variées (Greenwood et al., 1990; Duchenne et al., 1997; Bélanger et al., 2001; Giletto et Echeverría, 2012). La courbe critique de dilution de l'azote permet d'établir un diagnostic de l'état de nutrition azotée de la culture à partir de l'Indice de Nutrition Azotée (INN). Cet indice, déterminé comme le rapport entre la teneur observée en azote de la biomasse et la teneur en azote critique à tout moment de la culture, est l'indicateur le plus adapté pour l'évaluation du statut azoté de la culture (Lemaire et al., 1997). Pour les valeurs INN inférieures à 1, la biomasse est qualifiée en situation de déficience en azote, alors que pour des valeurs supérieures, la biomasse est considérée en excès d'azote. Une valeur égale ou proche de 1 correspond à l'optimum de la nutrition azotée de la culture en ce qui concerne la production de biomasse. Cela signifie que le contenu en azote de la culture assure la croissance maximale potentielle dans un contexte pédoclimatique donné sans faire d'hypothèse sur le rendement des cultures ou encore la qualité des récoltes. Afin de définir le statut azoté optimal en culture de pomme de terre permettant d'une part le développement maximal de la biomasse en cours de croissance et d'autre part l'obtention d'un rendement maximum en tubercules, il convient de définir le niveau seuil INN permettant d'atteindre les objectifs de rendements. Des valeurs INN légèrement supérieures à 1 ont été démontrées comme requises pour assurer un bon équilibre physiologique entre croissance de la biomasse et répartition des assimilats (Chambenoit et al., 2002).

En ce qui concerne les pratiques d'utilisation des engrais azotés minéraux de synthèse, la gestion de la fertilisation azotée de la culture de pommes de terre est encore le plus souvent basée sur l'application de doses d'assurance d'engrais azotées, le plus souvent excessives par rapport aux besoins. Ainsi, dans un contexte caractérisé par l'importance de la filière de la pomme de terre, le coût croissant des engrais azotés et la mise en place des différentes normes et de directives de

protection de l'environnement, il convient de viser le raisonnement de la fertilisation azotée de cette culture via l'application de doses d'engrais juste suffisantes pour assurer une production optimale en termes de rendement et de qualité commerciale des tubercules limitant au maximum les effets potentiellement négatifs sur l'environnement. En culture de pomme de terre, le raisonnement de la fertilisation azotée est d'autant plus important étant donné les caractéristiques déjà décrites d'utilisation de l'azote par la culture.

3. Raisonnement de la fertilisation azotée

Le raisonnement de la fertilisation azotée de la culture nécessite de prendre en considération, tout d'abord, les diverses sources d'azote pour les plantes au niveau du cycle de l'azote: dépôt atmosphérique des composés azotés, l'azote du sol, l'azote atmosphérique (N_2) fixé par les bactéries ou les algues, l'azote minéralisé à partir de la matière organique du sol, l'azote provenant de la fixation symbiotique des légumineuses, les apports d'engrais minéraux azotés et l'azote provenant des intrants organiques.

Les approches permettant le raisonnement de la fertilisation azotée des cultures ont été abordées au niveau de différents articles de revues (Schröder et al., 2000 ; Goffart et al., 2008 ; Samborski et al., 2009 ; Muñoz-Huerta et al., 2013). Les méthodes de raisonnement des apports azotés pour la pomme de terre combinent ou non deux approches: 1) une approche liée au sol et permettant la détermination de la disponibilité en azote dans le sol (Johnson et al., 2000) avant et pendant la culture, 2) une approche liée au végétal permettant la détermination du statut azoté de la biomasse aérienne de la culture par des méthodes invasives (Haase et al., 2000) ou non invasives (Booij et al., 2000).

3.1. Approche liée au sol

L'approche unique par le sol qui détermine les disponibilités actuelles et à venir en azote minéral du sol présente une lourdeur de réalisation et ne donne aucune information sur l'état des besoins de la culture à un moment précis de la saison culturale. Le bilan prévisionnel d'azote minéral du sol à l'échelle de la parcelle repose en partie sur la mesure de l'azote minéral dans le profil du sol à la plantation et permet de déterminer la dose d'azote jugée *a priori* optimale. Cette méthode développée par Hébert en 1969 vise à atteindre l'équilibre entre les besoins en azote et les fournitures en azote minéral du sol tenant ainsi compte de l'ensemble des entrées et des sorties d'azote du système sol-plante. La méthode du bilan prévisionnel d'azote intègre des facteurs tels que le rendement potentiel attendu, la variété, les propriétés du sol, les conditions météorologiques et les pratiques culturales (Goffart et al., 2008). Cependant, en raison de la faible absorption de l'azote en début de plantation et de la mobilité du nitrate dans le profil du sol, l'application d'une dose unique d'azote à la plantation apparaît peu judicieuse. De

plus, il est impossible de prévoir avec exactitude les besoins totaux de la plante en début de saison dans un contexte où les conditions météorologiques ont un impact majeur sur ces besoins en fonction de la biomasse produite. D'autre part, la minéralisation nette de l'azote organique du sol et son prélèvement par la culture sont très difficiles à prédire (Vos et MacKerron, 2000 ; Goffart et al., 2008).

Cette incertitude peut être contournée en fractionnant la dose d'azote totale conseillée sur base de la méthode du bilan prévisionnel et en modulant le complément, si besoin, en cours de saison (Goffart et al., 2008).

Les stratégies de fractionnement de la dose d'azote impliquent une détermination précise non seulement des doses d'engrais azotés à appliquer à la plantation en cours de saison, mais aussi des dates optimales d'application et de la prise en compte adéquate de la forme des fertilisants utilisés, tout particulièrement en cas d'application du complément d'azote en cours de saison. L'approche peut se résumer comme suit : appliquer la bonne dose d'engrais au bon moment et avec l'engrais le plus approprié selon les possibilités d'absorption de l'azote par la culture (humidité du sol, conditions d'ensoleillement, couverture du sol...). Cependant, comme signalé par Basso et al. (2011), l'optimisation de la fertilisation azotée basée sur la méthode du fractionnement reste complexe, puisque l'objectif attendu d'une fertilisation raisonnée de l'azote est la contribution à la fin de la saison au rendement en tubercules qui est chronologiquement très éloigné du moment de l'apport du complément azoté.

L'ajout et la modulation du complément de la dose d'azote nécessitent l'utilisation de méthodes liées à des mesures sur le végétal qui permettent de quantifier rapidement l'état azoté de la culture en plein champ et de fournir ainsi une réponse la plus immédiate possible à l'agriculteur. Cette stratégie de raisonnement de la fertilisation azotée vise au final une meilleure adéquation entre les besoins de la culture et les apports des engrais azotés.

3.2. Approche liée au végétal

L'approche par le végétal intègre les deux informations plante et sol; aussi bien l'état nutritionnel de la plante en cours de saison que la fourniture en azote minéral par le sol (Goffart et al., 2008). Deux types de méthodes existent: les méthodes invasives qui mènent à la destruction des échantillons végétaux prélevés et les méthodes non invasives sans destruction des échantillons prélevés.

Parmi les méthodes invasives, la digestion de Kjeldahl et la combustion de Dumas appliquées sur des échantillons secs, broyés et représentatifs de la biomasse analysée sont les méthodes classiques qui permettent de déterminer avec précision la concentration en azote. Contrairement à la méthode Kjeldahl qui détermine l'azote organique, la méthode Dumas détermine l'azote total contenu au niveau des tissus des végétaux analysés. La teneur en nitrate du jus de pétioles des feuilles permet de

déterminer le statut azoté de la culture au moment de l'échantillonnage par rapport à un abaque de référence (Van Loon et al., 1987; Olivier et al., 1999; Fox et al., 2008). Cependant, cette méthode ne prend pas en compte les formes d'azote autres que le nitrate dans la plante (Goffart et al., 2013). La méthode de spectrométrie dans le proche infrarouge sur échantillons de biomasse sèche et finement broyée a été démontrée comme une méthode indirecte intéressante pour déterminer l'azote total dans la plante permettant d'analyser rapidement un grand nombre d'échantillons (Young et al., 1997).

Pour être utilisables dans la pratique, les méthodes d'évaluation du statut azoté de la biomasse végétale aérienne doivent répondre à quatre critères: la mesure doit être sensible (*à savoir, permettre de discriminer des concentrations croissantes d'azote dans la biomasse aérienne analysée*), la mesure doit être précoce (*permettre la détection précoce d'une déficience en azote avant l'apparition de symptômes de chlorose sur le feuillage pour permettre l'application d'une dose complémentaire utile pour la croissance de la culture*), la mesure doit être exacte (*la valeur doit être juste et répétable*) et la mesure doit être spécifique (*idéalement être exclusivement reliée aux fournitures en azote et à la concentration en azote dans la plante sans interférence avec d'autres facteurs externes*). Par ailleurs, la méthode doit être facile à mettre en œuvre (*être d'emploi aisé, peu coûteuse et rapide en visant une utilisation répandue à grande échelle de la méthode par les utilisateurs*) (Goffart et al., 2013). En considérant ces critères, la teneur en nitrate du jus de pétioles des feuilles est une méthode sensible qui, cependant, a été remise en question pour la pomme de terre quant à sa spécificité (Goffart et al., 2002) et à sa variabilité (MacKerron et al., 1995 ; Goffart et al., 2002). De façon générale, la limitation des méthodes invasives est liée à l'échantillonnage destructif et laborieux dans sa mise en œuvre. Les approches invasives sont donc inappropriées à l'échelle de la parcelle en cours de saison, mais servent comme base aux méthodes de référence. Par exemple, les méthodes invasives d'analyse de la teneur en azote total au niveau des tissus végétaux peuvent être appliquées pour la détermination de la teneur critique en azote de la biomasse et de l'INN. Cependant, l'établissement de l'INN nécessite le prélèvement et le traitement laborieux de grands nombres d'échantillons de plantes tant dans des essais agronomiques avec des niveaux croissants de fumure azotée sur plusieurs années et dans diverses conditions pédoclimatiques, que pour une utilisation opérationnelle visant un conseil pour l'agriculteur en parcelle agricole. L'INN est donc utilisé comme méthode de référence et de calibration pour d'autres outils plus rapides d'utilisation non destructeurs de l'échantillon de plantes analysées.

L'approche invasive utilisée au niveau de cette thèse combine la spectrométrie dans le proche infrarouge et la méthode de Dumas pour construire la courbe critique de dilution de l'azote dans les conditions belges, élément incontournable dans le cadre d'une évaluation du statut azoté de la culture.

Les méthodes non invasives pour la détermination du statut azoté de la biomasse en plein champ sont basées, dans la grande majorité sur l'utilisation d'outils optiques (Booij et al., 2000 ; Goffart et al. 2008, 2013). Elles ont pour objectif, dans le cadre d'une stratégie de fractionnement de la dose d'azote, de fournir une réponse plus

immédiate sur le statut azoté de la biomasse, soit par analyses ponctuelles ou très localisées, soit par la collecte d'informations sur l'ensemble de la parcelle. Les appareils, qui utilisent le plus souvent des capteurs optiques, sont en effet associés à différents types de plateformes permettant de considérer différentes échelles spatio-temporelles pour l'acquisition de mesures. L'acquisition se fait, soit au sol à l'échelle de la feuille, de la plante ou de la canopée (par des mesures de contact par pincement de la feuille à l'aide d'outils manuels ou bien par télédétection rapprochée avec capteurs manuels ou embarqués sur un engin au sol), soit à l'échelle aérienne sur l'ensemble de la parcelle ou de plusieurs parcelles (télédétection aérienne à l'aide de capteurs embarqués sur des avions ou des drones), ou encore à l'échelle spatiale sur un territoire donné (télédétection spatiale à l'aide de capteurs embarqués sur des satellites) (Goffart et al., 2008, 2013; Tremblay et al., 2009, 2012).

Les mesures s'appuient sur le changement des caractéristiques spectrales des feuilles lié à l'état nutritionnel en azote de la biomasse aérienne de la culture. Cet état nutritionnel en azote affecte les propriétés d'absorptance, de transmittance, de réflectance et de fluorescence chlorophyllienne (ChlF) du feuillage pour différentes longueurs d'ondes dans les zones du visible et de l'infrarouge du spectre des rayonnements électromagnétiques. Les signatures spectrales qui en résultent permettent l'estimation d'indicateurs foliaires, encore appelés « proxies ». Ceux-ci sont le plus souvent basés sur les teneurs en chlorophylle et/ou en composés phénoliques des feuilles, en réponse à la concentration en azote de la biomasse.

Les indicateurs reliés à la teneur en chlorophylle, basés sur des mesures de **transmittance et de réflectance**, ont été largement étudiés dans le cadre de l'évaluation du statut azoté des cultures. Pour la pomme de terre par exemple, la concentration de la chlorophylle dans la feuille est considérée comme un bon indicateur de son statut en azote étant donné la relation positive et étroite avec sa concentration en azote (Vos et al., 1993).

Les mesures de transmittance à l'échelle foliaire fournies par les chlorophyllomètres reposent sur l'absorption de rayonnements électromagnétiques dans le rouge (R) et le proche infrarouge (PIR). La longueur d'onde du R est peu transmise étant donné sa forte absorption par la chlorophylle, alors que la longueur d'onde du PIR est transmise et son absorption très faible permet de mesurer l'absorption non chlorophyllienne liée aux parois cellulaires et à l'eau contenue dans les tissus. Une revue très complète sur les potentialités et l'utilisation du chlorophyllomètre, par exemple, le modèle scientifique SPAD502 (Minolta, Osaka, Japon) ou son équivalent commercial, l'Hydro N-Tester (HNT - Yara, Oslo, Norvège), pour estimer le statut en azote de la pomme de terre, a été réalisé par Gianquinto et al. (2004). La limitation majeure réside dans le fait que le chlorophyllomètre détecte essentiellement des situations de déficience marquée en azote pour des niveaux faibles à moyens de concentration en azote dans le feuillage et il montre peu voire aucune discrimination pour des concentrations plus élevées liées à un problème de saturation en chlorophylle dans les tissus végétaux (Gianquinto et al., 2004). Les mesures de transmittance à l'aide du

chlorophyllomètre pourraient également présenter un retard de détection par rapport à l'entrée réelle en carence azotée (Tremblay et al., 2012). Une autre limitation à l'utilisation des outils optiques pour l'estimation de la teneur en chlorophylle, mesurée par unité de surface, est sa dépendance à la masse foliaire (Cerovic et al., 2012) qui influence à son tour la prédiction de la teneur en azote de la feuille (par unité de matière sèche) par le chlorophyllomètre (Peng et al., 1993).

Plus récemment, le Dualex (Force-A, Université de Orsay, de Paris Sud) qui permet par transmittance d'estimer la teneur en chlorophylle a été étudié dans le cadre de l'évaluation du statut azoté de la culture (Cerovic et al., 2012). Les longueurs d'ondes utilisées par le Dualex sont centrées sur 710 nm pour le R et sur 850 nm pour le PIR ; ces longueurs diffèrent de celles utilisées par l'Hydro N-Tester qui sont centrées sur 650 nm (R) et sur 940 nm (PIR). La bande de longueurs d'onde R utilisée pour l'Hydro N-Tester est caractérisée par un coefficient élevé d'absorption par la chlorophylle (pic d'absorption maximale de la lumière rouge par la chlorophylle), tandis que celle fournie par le Dualex est caractérisée par un faible coefficient d'absorption de la chlorophylle (Cerovic et al., 2012). L'utilisation de la longueur d'onde R avec un coefficient élevé d'absorption de la chlorophylle (cas de l'Hydro N-Tester) augmente la précision pour des concentrations faibles à moyennes en chlorophylle au niveau des feuilles et réduit la précision pour des concentrations élevées en chlorophylle. L'utilisation de la longueur d'onde R à coefficient moyen d'absorption de la chlorophylle (cas du Dualex) réduit par contre la précision pour toute la gamme de teneurs en chlorophylle, mais vise à atténuer la saturation de la mesure liée à des teneurs élevées en chlorophylle au niveau des feuilles (Cerovic et al., 2012).

Les indicateurs reliés à la teneur en chlorophylle à l'échelle de la canopée sont principalement basés sur des mesures de la fraction de lumière incidente réfléchie par la canopée. Ces méthodes visent à estimer des variables biophysiques de cette dernière telles que par exemple l'indice de surface foliaire ou *Leaf Area Index* (LAI) ou le *Green Area Index* (GAI), qui sont des paramètres étroitement liés à la concentration en azote de la plante et à la teneur en chlorophylle des feuilles (Goffart et al., 2013).

À partir de ces mesures de réflectance fournies pour différentes bandes de longueurs d'onde situées dans le visible et le proche infrarouge, il est possible de déterminer des indices de végétation (IV) permettant de caractériser la concentration en azote de la culture, et de caractériser le statut azoté de la culture lorsque des valeurs seuils d'entrée en carence azotée de ces indices sont établies. Les IV les plus intéressants pour le statut azoté combinent généralement des bandes de longueurs d'onde dans le vert, le rouge (plus particulièrement le red-edge) et le proche infrarouge (Schröder et al., 2000 ; Goffart et al., 2013) définies de manière plus ou moins étroite selon que l'on travaille avec des technologies multispectrales ou hyperspectrales.

Les outils optiques permettant de mesurer la réflectance par la biomasse végétale peuvent être scindés en outils passifs et actifs en fonction de l'origine des longueurs d'onde utilisées pour l'excitation de la chlorophylle, respectivement soit la lumière solaire, soit une source de lumière artificielle. Parmi les outils passifs manuels qui mesurent la réflectance de la biomasse à partir de la lumière du soleil, le radiomètre

Cropscan (Cropscan, Rochester, USA), ou encore le spectroradiomètre FieldSpec (Analytical Spectral Devices, Inc., Boulder, CO, USA) ont été utilisés en recherche dans le cadre de l'estimation du statut azoté de la culture de pomme de terre (Goffart et al., 2008 ; Van Evert et al., 2012). Des exemples d'outils actifs tels que les outils manuels Crop Circle (Holland Scientific, Lincoln, NE, USA) et GreenSeeker (Trimble Inc., Sunnyvale, CA, USA), ou encore le capteur N-Sensor ALS (Yara International, Oslo, Norway) embarqué sur tracteur ont également été utilisés dans le cadre de l'estimation du statut azoté de la culture (Tremblay et al., 2009 ; Padilla et al., 2015) .

Les mesures de réflectance présentent un intérêt certain pour l'évaluation du statut azoté des cultures, particulièrement via les mesures aériennes et spatiales qui permettent, contrairement aux mesures localisées au sol, un suivi de la biomasse sur toute la surface de la parcelle avec intégration de l'ensemble de l'hétérogénéité intraparcellaire dans les images numériques. Cependant, en prenant en compte ces mesures de réflectance, on peut craindre un retard ou un défaut de détection par rapport à l'entrée réelle en carence azotée, particulièrement avec les mesures aériennes et spatiales où chaque pixel est un signal mixte de la réflectance lié à la canopée et au sol. En début de développement de la culture jusqu'au stade phénologique de fermeture des rangs par le feuillage, la part de réflectance liée au sol reste importante, particulièrement en culture de pommes de terre. Certains indices de végétation, tels que SAVI (*Soil-Adjusted Vegetation Index*) (Huete, 1988), ou par exemple OSAVI (*Optimized Soil-Adjusted Vegetation Index*) (Rondeaux et al., 1996), visent à atténuer cette part de réflexion liée au sol, mais leur mise en œuvre reste plus compliquée.

La capacité d'utilisation du satellite européen SPOT-5 (Satellite Pour l'Observation de la Terre – 5) étudié dans le cadre de la caractérisation du statut azoté des cultures de froment d'hiver et de pomme de terre ont clairement mis en évidence les potentialités des images satellites à discriminer entre des doses croissantes de fumures azotées et avec une faible variation des IV entre pixels d'une même zone (Goffart et al., 2010). Kooistra et al. (2016) ont estimé avec précision la teneur en chlorophylle de la pomme de terre à partir des données satellites (RapidEye) acquises vers la fin de la saison de croissance. Hunt et al. (2018) concluent que les signaux de réflectance, particulièrement les indices NDVI (*Normalized Difference Vegetation Index*) et GNDVI (*Green Normalized Difference Vegetation Index*) acquis à partir de drones, ne sont pas utiles dans le cadre d'une gestion de la fertilisation azotée en culture de pommes de terre en cours de saison en raison du retard de détection des modifications de la teneur en chlorophylle des feuilles et du LAI. Ces observations sont néanmoins à confirmer sous nos latitudes, car elles ne semblent pas corroborées par des travaux récents réalisés par les équipes du Centre wallon de Recherches agronomiques et de l'Université catholique de Louvain, dans le cadre du projet BELCAM (mené au CRA-W de 2014 à 2019 et financé par BELSPO). Ces travaux basés sur l'utilisation des nouveaux satellites européens Sentinel 2 permettent maintenant un réel monitoring des parcelles agricoles grâce à des résolutions spatiales et temporelles nettement améliorées ces dernières années. Pour une culture comme la pomme de terre, exigeante en azote et à cycle végétatif

court, ces éléments sont essentiels à considérer si l'on recherche l'efficacité maximale d'un apport complémentaire en azote dans le cadre d'une pratique de fractionnement des apports azotés sous forme d'engrais minéral rapidement absorbé et assimilé par la culture, telle que déjà préconisée et appliquée en Belgique et à l'étranger (Goffart et al., 2004).

Outre les limitations des indicateurs chlorophylle liées à la saturation, au retard ou défaut de détection et à la dépendance à la masse foliaire; ces indicateurs mesurés par transmittance ou réflectance présentent un manque de spécificité par rapport à l'azote. En effet, la chlorophylle est influencée par plusieurs autres facteurs génétiques, phytotechniques et environnementaux. Parmi ceux-ci, le facteur variétal, le facteur site (Goffart et al., 2002), l'irrigation (Schlemmer et al., 2005) ou encore un stress nutritionnel autre que le stress azoté par exemple la déficience en magnésium (Shaahan et al., 1999) influent sur les mesures de la chlorophylle. Ces limitations suggèrent l'intérêt de la recherche d'autres méthodes plus performantes dans une optique d'évaluation du statut azoté de la biomasse aérienne de la culture de pomme d'une part, pour améliorer la sensibilité et la précocité des mesures et d'autre part, pour tenter de s'affranchir des facteurs limitant la spécificité des mesures. Cette thèse s'intéresse spécifiquement aux potentialités de la méthode de la ChlF dans le cadre de l'évaluation du statut azoté de la culture de pomme de terre pour pallier les limitations décrites.

4. Fluorescence chlorophyllienne et composés phénoliques

La ChlF correspond à des photons de lumière dans le rouge et le proche infrarouge émis par la chlorophylle *a* après absorption de la lumière. La ChlF des feuilles est une signature spectrale qui est utilisée depuis des décennies pour quantifier l'efficacité photosynthétique des plantes laquelle reflète à son tour les impacts des facteurs environnementaux sur une plante. Plus récemment, cette technique est utilisée pour estimer des indicateurs foliaires dont les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes.

Les indicateurs reliés à la teneur en composés phénoliques, basés sur des mesures de ChlF. Les composés phénoliques possèdent des pics typiques d'absorption dans l'ultra-violet (UV). En raison du grand nombre de composés foliaires qui absorbent dans l'UV, une faible réflectance et presque pas de transmittance des feuilles dans cette région spectrale, la méthode spectroscopique classique ne peut être facilement appliquée pour estimer ces indicateurs foliaires (Goulas et al., 2004). La fluorescence induite sous UV exploite la structure de la feuille avec d'une part, l'épiderme où sont situés majoritairement les composés phénoliques et d'autre part, le mésophylle contenant la chlorophylle. En situation de déficience en azote, la concentration en composés phénoliques augmente de façon générale. Plusieurs études ont prouvé la présence d'une relation inverse entre la teneur en flavonoïdes et la concentration en azote de différentes espèces (Stewart et al., 2001 ; Norbaek et al. 2003 ; - Mittelstraß et al., 2006 ; Lea et al., 2007). Ces métabolites secondaires sont mesurables de manière opérationnelle à l'échelle

foliaire par des fluorimètres tels que le Dualex, capteur à pince, et le Multiplex, capteur sans contact opérant par télédétection rapprochée (Force-A, Orsay, Paris, France). L'excitation UV (375 nm) est absorbée majoritairement par les flavonoïdes de l'épiderme (effet-écran), induisant ainsi une diminution de l'excitation UV qui atteint la chlorophylle du mésophylle et donc une diminution de la ChlF induite sous cette longueur d'onde. L'excitation rouge atteint, intacte, la chlorophylle du mésophylle sans être absorbée par les composés phénoliques de l'épiderme et induit une ChlF plus importante que celle observée suite à l'excitation UV. L'évaluation du statut azoté des feuilles repose ainsi sur l'exploitation du rapport des fluorescences chlorophylliennes mesurées dans le spectre du proche infrarouge et induites sous excitations UV et du rouge (Cartelat et al., 2005 ; Cerovic et al., 2005).

Bien que reposant sur un principe similaire de mesure pour l'estimation des flavonoïdes, des différences existent entre les deux types de fluorimètres. Les surfaces foliaires considérées lors de la prise de mesure sont différentes : pour le Dualex, il s'agit d'une surface de 19-20 mm² et qui correspond à une mesure d'une partie de la foliole, alors que pour le cas du Multiplex, il s'agit d'une surface de 50 cm² qui correspond à un signal mixte de folioles, de pétioles et d'interstices. Le Dualex utilise une boucle de rétroaction électronique pour réduire les problèmes liés à la variation de la ChlF en minimisant la différence entre les fluorescences variables induites respectivement sous excitation R et UV (Goulas et al., 2004). Le Multiplex, par contre, ne possède pas de boucle de rétroaction, mais grâce à l'alternance rapide des sources de lumière entre les deux excitations, les fluorescences induites respectivement sous excitation R et UV restent constantes. En outre, le Multiplex repose sur une série d'excitations et de détections de la ChlF qui correspond à la résultante moyenne de 500 signaux acquis pendant un laps de temps très court (inférieur à 1 seconde).

Contrairement aux mesures de réflectance souvent utilisées, la ChlF, bien qu'ayant un signal relativement plus faible, présente une plus grande sensibilité, puisque le signal de fluorescence ne provient que des parties vertes du végétal (Lichtenthaler et al., 1988). La ChlF est également décrite comme étant une signature spectrale précoce pour détecter les carences en azote (Longchamps et al., 2014) comparativement aux mesures de chlorophylle qui pourraient présenter un retard de détection par rapport à l'entrée réelle en carence azotée. Cet élément est un aspect important à prendre en compte pour permettre l'application d'une dose complémentaire d'engrais azotés utile pour la croissance de la culture particulièrement en culture de pomme de terre à cycle de croissance court, comme déjà mentionné à plusieurs reprises.

Le rapport [chlorophylle]/[flavonoïdes] est décrit comme étant un indicateur pertinent pour l'évaluation du statut azoté des plantes dans une optique de raisonnement des apports de la fertilisation azotée (Cerovic et al., 2002 ; Cartelat et al., 2005 ; Agati et al., 2013). Ce rapport est un meilleur indicateur du statut azoté de la culture que la chlorophylle seule, car ce ratio est indépendant de la masse foliaire par unité de surface (Cerovic et al., 2012).

Contrairement aux indicateurs chlorophylle mesurés par le chlorophyllomètre qui détectent essentiellement des situations de déficience marquée en azote, le rapport

[chlorophylle]/[flavonoïdes] permet d'étendre la gamme de discrimination pour les différents niveaux de fumure azotée testés en raison de la réaction inverse de la chlorophylle et des flavonoïdes vis-à-vis de l'azote (Cerovic et al., 2012 ; Agati et al., 2013). Ce rapport possède également l'avantage d'atténuer, au moins partiellement, l'hétérogénéité longitudinale dans la feuille (Cartelat et al., 2005).

Le rapport [chlorophylle]/[flavonoïdes] peut être calculé par l'utilisation du chlorophyllomètre combiné au Dualex (Cartelat et al., 2005 ; Demotes-Mainard et al., 2008) ou bien directement à partir d'une version récente du Dualex. Le fluorimètre Multiplex permet également de mesurer directement, à partir des signaux de fluorescence, un indice reliant la teneur en chlorophylle et la teneur en flavonoïdes.

Les indicateurs flavonoïdes seuls ou combinés aux indicateurs chlorophylle ont été étudiés dans le cadre de l'évaluation du statut azoté pour plusieurs cultures (Cartelat et al., 2005; Fortier et al., 2006; Agati et al., 2013 ; Padilla et al., 2014 ; Cerovic et al., 2015). En culture de pomme de terre, deux équipes de recherche ont étudié (Mittelstraß et al., 2006, Jin et al. 2014) à notre connaissance l'effet de la fumure azotée sur l'accumulation de ces métabolites secondaires au niveau des feuilles sous conditions contrôlées. Sur base des éléments qui précèdent, la prise en compte de la ChlF liée à l'estimation de la teneur en flavonoïdes apparaît prometteuse dans l'évaluation du statut azoté de la culture de pomme de terre.

Les approches non invasives considérées au niveau de cette thèse se limitent à l'échelle du sol selon des mesures de contact par pincement de la feuille ou bien de télédétection rapprochée.

Il est à noter que dans le cadre d'un suivi des besoins en azote de la culture, différentes échelles de temps sont utilisées dans la littérature : dates calendrier, jours après plantation, jours après émergence (JAE), taille des tubercules et échelle thermique. Les dates calendrier et les jours après plantation sont faciles et précis, mais ne correspondent pas nécessairement au développement de la culture (Goffart et al., 2002) et ne sont pas reliés aux conditions climatiques de l'année d'expérimentation. L'échelle thermique exprimée en degrés jour de croissance constitue un bon indicateur du développement de la plante et est donc plus appropriée pour suivre l'évolution du statut azoté de la culture. L'utilisation de l'échelle thermique plutôt que les jours après plantation permet d'obtenir une relation polyvalente qui est plus facilement reliée aux différentes dates de plantation, saisons culturales et sites (Padilla et al., 2015). Cependant, l'utilisation de l'échelle thermique n'est pas facile dans un cadre pratique d'implémentation de la stratégie de suivi du statut azoté de la culture. Le nombre de JAE (fixée à partir de 75 % du nombre attendu de plantes/ha) apparaît comme un bon compromis entre précision et faisabilité (Goffart et al., 2002).

Selon Gianquinto et al. (2004), la période optimale pour l'ajout du complément en azote s'étale entre 40 à 45 JAE. Vos (1999) étend la période pour laquelle l'application de la dose d'azote peut être ajustée jusqu'à 60 JAE. Selon les travaux d'Olivier et al. (2006), la période comprise entre 20 et 55 JAE est la période optimale pour l'évaluation du statut azoté de la biomasse de la culture de pomme de

terre, c'est à dire approximativement entre le 10 juin et le 15 juillet dans les conditions belges pour une date de plantation normale réalisée à la mi-avril et une levée apparue durant la dernière décade de mai.

5. Structure et objectifs de la thèse

La structure de la thèse est illustrée au niveau de la Figure 2.

Le chapitre 2 traite de l'état actuel des connaissances en matière d'évaluation du statut azoté des cultures par les mesures indirectes de la ChlF sous forme d'une revue publiée [Ben Abdallah F., Philippe W. & Goffart JP. 2016. *Utilisation de la fluorescence chlorophyllienne pour l'évaluation du statut azoté des cultures (synthèse bibliographique)*, BASE [En ligne], Volume 20, Numéro 1, 83-93 URL : <https://popups.uliege.be:443/1780-4507/index.php?id=12627>]. La revue présente deux approches de la ChlF dont l'une est liée à l'activité photosynthétique de la plante et l'autre est liée à l'estimation des indicateurs azotés foliaires (la chlorophylle et les composés phénoliques). Ce chapitre orienté du point de vue des mécanismes de la ChlF a permis de préciser les objectifs de la thèse.

Le premier objectif de la recherche est d'étudier les potentialités des indicateurs liés à la teneur en composés phénoliques des feuilles (plus spécifiquement les flavonoïdes) et basés sur la signature de la ChlF pour l'évaluation du statut azoté de la culture de pomme de terre. Le second objectif est d'évaluer l'effet d'une déficience en azote sur l'accumulation des composés phénoliques des feuilles de pomme de terre afin de contribuer à l'établissement univoque du lien entre la variation de la concentration en azote des feuilles et la variation en composés phénoliques des feuilles. Ces deux objectifs permettent de contribuer à l'établissement d'indicateurs pertinents intégrables dans des outils d'aide à la décision pour la gestion raisonnée de la fertilisation azotée de la culture de pomme de terre. En ce sens cette thèse a pour ambition de définir pour une culture importante en Belgique des éléments centraux de la chaîne décisionnelle dans la gestion des apports d'engrais azotés minéraux en agriculture conventionnelle ou intégrée, ou d'engrais organiques azotés à effet rapide en agriculture biologique.

De manière plus concrète, les objectifs de la thèse peuvent être traduits sous forme des questions de recherche suivantes auxquelles ce travail a eu pour ambition de répondre de la manière la plus complète possible :

- I. Quelle est la méthode de référence spécifique pour la culture de pomme de terre dans les conditions belges permettant d'évaluer le statut azoté de la culture et de définir l'optimum azoté de la biomasse durant la saison de culture ?

- II. Parmi les méthodes indirectes d'évaluation du statut azoté des cultures, quelles sont les caractéristiques des mesures de la ChlF, liées à la teneur en composés phénoliques des feuilles, qui en font un outil pertinent pour la culture de pomme de terre dans un cadre pratique de la gestion de sa fertilisation azotée?
- III. À l'échelle des feuilles de pomme de terre, les variations de concentrations en azote sont-elles en relation avec des variations de concentration en composés phénoliques ou de classes spécifiques de composés phénoliques ?

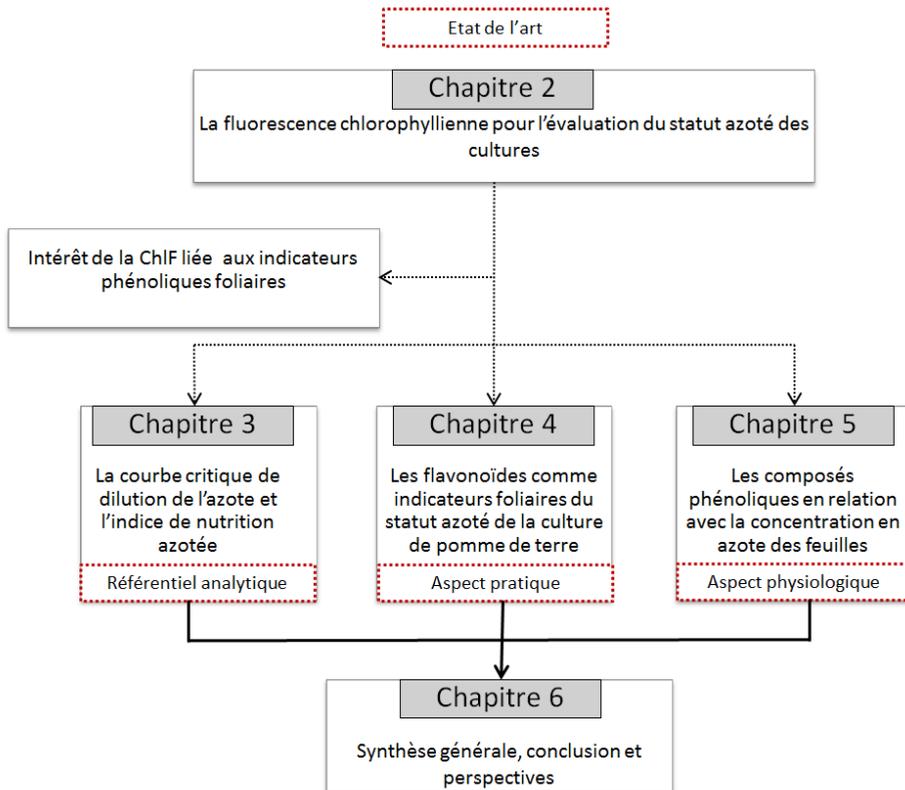


Figure 2. Diagramme de la stratégie de recherche de la thèse

Le chapitre 3 considère un élément indispensable dans le cadre d'une évaluation du statut azoté de la culture de pomme de terre dans les conditions belges. Il traite la question de recherche I au travers de l'article publié [Ben Abdallah F., Olivier M., Goffart J.P. & Minet O. 2016. *Establishing the Nitrogen Dilution Curve for Potato Cultivar Bintje in Belgium. Potato Research*, 59: (3), 241-258]. Cet article porte sur l'établissement de la courbe critique de dilution de l'azote pour la variété Bintje en Belgique. Le chapitre présente le référentiel analytique spécifique pour la culture de

pomme de terre en Belgique permettant à partir du calcul de l'indice de nutrition azotée d'évaluer le statut azoté de la culture et d'en définir l'optimum azoté de la biomasse.

Le chapitre 4 répond à la question de recherche II au travers de l'article [Ben Abdallah, F. Philippe, W. & Goffart, J. P. 2018. Comparison of optical indicators for potato crop nitrogen status assessment including novel approaches based on leaf fluorescence and flavonoid content, *Journal of Plant Nutrition*, 41: (20), 2705-2728, DOI:10.1080/01904167.2018.1510514]. Au niveau de cet article, les potentialités des mesures de la ChlF à partir des indicateurs liés à la teneur en composés phénoliques (en particulier la classe des flavonoïdes et la sous-classe des flavonols) seuls ou combinés à la teneur en chlorophylle sont explorés pour l'estimation du statut azoté de la biomasse de la culture de pomme de terre. Les critères investigués dans cet article sont la sensibilité, la précocité de détection de l'entrée en carence azotée, l'exactitude et la spécificité des mesures non invasives de la ChlF en comparaison avec d'autres mesures spectrales de transmittance et de réflectance usuellement utilisées en culture de pomme de terre et liées à la teneur en chlorophylle des feuilles. Le chapitre 4 est orienté vers une approche appliquée pour l'évaluation du statut azoté de la culture de pomme de terre et la mise en œuvre des indicateurs flavonoïdes mesurés par ChlF dans le cadre d'un système d'aide à la décision en cours de saison pour la gestion des apports azotés en pomme de terre.

Le chapitre 5 examine au travers d'un quatrième article encore à soumettre [Ben Abdallah F., Goffart JP & Romnée JM . *Effects of nitrogen fertilization on the accumulation of phenolic compounds on potato leaves*] la question de recherche III qui porte sur la caractérisation et l'identification de la présence spécifique de classes de composés phénoliques et leur estimation quantitative au niveau des feuilles de deux variétés de pommes de terre en réponse à une déficience en azote. Ce chapitre vérifie également, en réponse à la question de recherche II, si l'estimation de la concentration quantitative de composés phénoliques (en particulier des flavonols) est possible à partir des mesures indirectes de la ChlF. Ce chapitre est orienté vers la compréhension physiologique du lien entre la variation de la concentration en azote des feuilles et la variation en composés phénoliques des feuilles de pomme de terre.

Le chapitre 6 présente la synthèse générale, la conclusion est les perspectives.

Références bibliographiques

Agati G. et al., 2013. Fluorescence-based versus reflectance proximal sensing of nitrogen content in *Paspalum vaginatum* and *Zoysia matrella* turfgrasses. *Eur. J. Agron.*, 45, 39-51.

- Basso B., Ritchie J.T., Cammarano D., Sartori L. 2011. A strategic and tactical management approach to select optimal N fertilizer rates for wheat in a spatially variable field. *Eur. J. Agron.* 35(4), 215-222.
- Belgapom. 2017. Le négoce et la transformation belge de la pomme de terre. Accessed 20 Oktober 2018 . URL : <https://belgapom.be/fr/blog/>.
- Bélangier G. et al., 2001. Critical nitrogen curve and nitrogen nutrition index for potato in eastern Canada. *Am. J Potato Res*, 78(5): 355-364.
- Booij R., Valenzuela J.L. & Aguilera C. 2000. Determination of crop nitrogen status using invasive methods. In: Haverkort A.J., Mac Kerron D.K.L. (Eds.), *Management of nitrogen and water in potato production*. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands, pp 72-93.
- Cartelat A. et al., 2005. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crop Res.*, 91, 35-49.
- Cerovic Z.G. et al., 2015.-Non-destructive diagnostic test for nitrogen nutrition of grapevine (*Vitis vinifera* L.) based on Dualex leaf-clip measurements in the field. *J Agric Food Chem*,63:3669-3680.
- Cerovic Z.G., Masdoumier G., Ghozlen N.B. & Latouche G., 2012. A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiol. Plant.*, 146(3), 251-260.
- Cerovic, Z.G. Cartelat, A., Goulas, Y., and S. Meyer. 2005. In-the-field assessment of wheat-leaf polyphenolics using the new optical leaf-clip Dualex. In: Stafford JV (Ed.) *Precision Agriculture* Wageningen Academic Publishers. Wageningen. 05 pp 243-250.
- Chambenoit C., Laurent F, Machet JM, Scheurer O. 2002. Fertilisation azotée de la pomme de terre, Guide pratique Editions Agro-Transfert, Inra, Itcf/Itpt, 128 p.
- Demotes-Mainard S., Boumaza R., Meyer S. & Cerovic Z.G., 2008. Indicators of nitrogen status for ornamental woody plants based on optical measurements of leaf epidermal polyphenol and chlorophyll contents. *Sci Hortic*, 115(4), 377-385.

- Devaux A. et al., 2020. Global Food Security, Contributions from Sustainable Potato Agri-Food Systems. In: Campos H., Ortiz O. (Eds). The Potato Crop. Cham (Switzerland). Springer, Cham. ISBN 978-3-030-28683-5. pp. 3-35.
- Duchenne T., Machet J.M. & Martin M. 1997. In: Lemaire G (Ed) Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops, Springer-Verlag, Berlin, pp119-130.
- FAO. 2016 Food and agriculture organisation of the United Nations; statistic division Accessed 22 Oktober 2018. URL : <http://www.fao.org/faostat/>.
- Fortier E. et al., 2006. Influence of irrigation and nitrogen fertilization on broccoli polyphenolics concentration. In International Symposium on Vegetable Safety and Human Health 856 (pp. 55-62).
- Fox R.H. & Walthall C.L. 2008. Crop monitoring technologies to assess nitrogen status J.S. Schepers, W.R. Raun (Eds.), Nitrogen in agricultural systems, agronomy monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, USA (2008), pp. 647-674.
- Gianquinto G. et al., 2004. The use of hand-held chlorophyll meters as a tool to assess the nitrogen status and to guide nitrogen fertilization of potato crop. Potato Res., 47, 35-80.
- Giletto C.M. & Echeverría H.E. 2012. Critical Nitrogen Dilution Curve for Processing Potato in Argentinean Humid Pampas. Am J Potato Res 89: 102-110. <http://dx.doi.org/10.1007/s12230-011-9226-z>. Accessed 02 January 2015
- Goffart J.P., Abras M. & Ben Abdallah F. 2013. Gestion de la fertilisation azotée des cultures de plein champ. Perspectives d'amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'azote sur base du suivi du statut azoté de la biomasse aérienne. BASE , Vol. 17, 1 : 221-230.
- Goffart J.-P. et al., 2010. SPOT 5 multispectral data potentialities to monitor potato crop nitrogen status at specified field scale. In: *Proceedings of the 10th International Conference on precision agriculture, July 18-21, 2010, Denver, Colorado, USA*, 65.
- Goffart J.P., Olivier M. & Frankinet M. 2008. Potato crop nitrogen status assessment to improve N fertilization management and efficiency: Past-Present-Future. Potato Res, Vol. 51 : 355-383.

- Goffart J.P. & Olivier M., 2004. Management of N-fertilization of the potato crop using total N-advice software and in-season chlorophyll meter measurements. In: Haverkort A.J. & MacKerron D.K.L., eds. Decision support systems in potato production: bringing models to practice. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 68-83.
- Goffart J.P., Olivier M., Destain J.P. & Frankinet M. 2002. Stratégie de gestion de la fertilisation azotée de la pomme de terre de consommation. Centre de Recherches Agronomiques de Gembloux (Ed.), Gembloux, Belgium, pp. 118.
- Goulas Y., Cerovic Z. G., Cartelat A., & Moya I. 2004. Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *App Optics*, 43(23) : 4488-4496.
- Greenwood D.J. et al.1990. Decline in percentage N of C3and C4 crops with increasing plant mass. *Ann Bot*, 66:425-436.
- Haase N.U., Goffart J.P., MacKerron & Young M.W.2000. Determination of crop nitrogen status using invasive methods. In: Haverkort A.J., Mac Kerron D.K.L. (Eds.), Management of nitrogen and water in potato production. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands, pp 55-71.
- Hack H. et al. 1993. Scale for optimization growth stages of potato (*Solanum tuberosum* L.). Proceedings of the 12th triennial conference of EAPR, July 18-23/1993-Paris, France, 153-154.
- Hébert J., 1969. La fumure azotée du blé tendre d'hiver. *Bull. techn. Inform. Min. Agric.*, 224, 755-766.
- Hirel B., Le Gouis J., Ney B., & Gallais A. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *J Exp Bot*, 58(9), 2369-2387.
- Huete A.R. 1988. A soil-adjusted vegetation index (SAVI). *Rem Sens Environ* 25:295–309
- Hunt E. et al., 2018. Monitoring nitrogen status of potatoes using small unmanned aerial vehicles. *Precis Agric*, 19(2), 314-333.

- Jin X. et al. 2014. The effect of nitrogen supply on potato yield, tuber size and pathogen resistance in *Solanum tuberosum* exposed to *Phytophthora infestans*. *Afr. J. Agric. Res.*, 9 (35), 2657-2663.
- Johnson P.A., Postma R., Goffart J.P. & Salomez J. 2000. Sampling and analysis of soils for soil nitrogen status. In: Haverkort A.J., Mac Kerron D.K.L. (Eds.), *Management of nitrogen and water in potato production*. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands, pp 155-164.
- Kooistra L. & Clevers J. G. P. W. 2016. Estimating potato leaf chlorophyll content using ratio vegetation indices, *Remote Sensing Letters*, 7:6, 611-620, DOI: 10.1080/2150704X.2016.1171925.
- Lea U.S., Slimestad R., Smedvig P., Lillo C. 2007. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta*, 225, 1245–1253.
- Lebrun P. & Florins D. 2018. Synthèse de la saison de commercialisation 2017/2018 Fiwap-Info N° 158 (Avril – Juin 2018), pp26-38.
- Lemaire G. & Salette J. 1984. Relation entre dynamique de croissance et dynamique de prélèvement d'azote pour un peuplement de graminées fourragères. I. - Etude de l'effet du milieu. *Agronomy*, 4 (5) : 423-430.
- Lemaire G. & Gastal F. 1997. N uptake and distribution in plant canopies. In: Lemaire G (ed) *Diagnosis of the nitrogen status in crops*. Springer, Heidelberg, pp 3–43.
- Lichtenthaler H.K. & Rinderle U. 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Crit Rev Anal Chem*, 9(1), 29-85.
- Longchamps L., & Khosla, R. 2014. Early detection of nitrogen variability in maize using fluorescence. *Agron J*, 106(2), 511-518.
- MacKerron D. K. L., Young M. W. & Davies, H. V. 1995. A critical assessment of the value of petiole sap analysis in optimizing the nitrogen nutrition of the potato crop. *Plant Soil*, 172(2), 247-260.

- Maheswari M., Murthy A. N. G. & Shanker A. K. 2017. Nitrogen Nutrition in Crops and Its Importance in Crop Quality. The Indian Nitrogen Assessment, 175–186. doi:10.1016/b978-0-12-811836-8.00012-4.
- Mittelstraß K. et al., 2006. Modification of primary and secondary metabolism of potato plants by nitrogen application differentially affects resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Plant Biol*, 8, 653–661.
- Mosier A.R., Syers J.K. & Freney J.R. 2004. Nitrogen fertilizer: an essential component of increased food, feed, and fiber production. In: Mosier, A.R., Syers, J.K., Freney, J.R. (Eds.), *Agriculture and the Nitrogen Cycle: Assessing the Impacts of Fertilizer Use on Food Production and the Environment*. SCOPE 65. Island Press, Washington, DC, pp. 3–15.
- Muñoz-Huerta et al., 2013. A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors*, 13(8), 10823–1084.
- Norbaek, R. et al., 2003. Flavone C-glycoside, phenolic acid, and nitrogen contents in leaves of barley subject to organic fertilization treatments. *J Agric Food Chem* 51, 809–813.
- Olivier M., Goffart J.P., Sinnaeve G. & Dardenne P. 1999. Evaluation of invasive and non-invasive methods to assess the nitrogen status of the potato crop in the course of the season. In: *Proceedings of the 14th EAPR Triennial Conference, 2-7 May 1999, Sorrento, Italy*. Sorrento, Italy: Assessorato Agricoltura, Regione Campania, 134- 135.
- Olivier M., Goffart J. P. & Ledent J. F. 2006. Threshold value for chlorophyll meter as decision tool for nitrogen management of potato. *Agron J*, 98(3), 496-506.
- Padilla F. M., Peña-Fleitas M. T., Gallardo M. & Thompson R. B. 2015. Threshold values of canopy reflectance indices and chlorophyll meter readings for optimal nitrogen nutrition of tomato. *Ann App Biol*, 166(2), 271-285.
- Padilla F. M., Peña-Fleitas M. T., Gallardo M. & Thompson R. B. 2014. Evaluation of optical sensor measurements of canopy reflectance and of leaf flavonols and chlorophyll contents to assess crop nitrogen status of muskmelon. *Eur J Agron*, 58, 39-52.

- Peng S., García F. V., Laza R. C. & Cassman K. G. 1993. Adjustment for specific leaf weight improves chlorophyll meter's estimate of rice leaf nitrogen concentration. *Agron J*, 85(5), 987-990.
- Rondeaux G., Steven M. & Baret F. 1996. Optimization of soil-adjusted vegetation indices. *Rem Sens Environ* 55:95–107
- Samborski S. M., Tremblay N., & Fallon E. 2009. Strategies to make use of plant sensors-based diagnostic information for nitrogen recommendations. *Agron J.*, 101(4), 800-816.
- Schlemmer M. R., Francis D. D., Shanahan J. F., & Schepers J. S. 2005. Remotely measuring chlorophyll content in corn leaves with differing nitrogen levels and relative water content. *Agron J.*, 97(1), 106-112.
- Schröder, J.J., J.J. Neetson, O. Oenema & Struik. P.C. 2000. Does the crop or the soil indicate how to save nitrogen in maize production? Reviewing the state of the art. *Field Crops Res*, 66:151–164.
- Shaahan M. M., El-Sayed A. A., & El-Nour E. A. 1999. Predicting nitrogen, magnesium and iron nutritional status in some perennial crops using a portable chlorophyll meter. *Sci Hortic*, 82(3-4), 339-348.
- STATBEL. 2017. L'office belge de statistique, Accessed 22 Oktober 2018 . URL : <https://statbel.fgov.be>
- Stewart, A. J. et al., 2001. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell Environ.*, 24(11), 1189-1197.
- Tremblay N., Wang Z. & Cerovic Z.G. 2012. Sensing crop nitrogen status with fluorescence indicators. A review. *Agron Sustain Dev.*, 32(2), 451-464.
- Tremblay N. et al., 2009. A comparison of crop data measured by two commercial sensors for variable-rate nitrogen application. *Precis Agric*, 10(2), 145.
- Vandenbergh C., De Toffoli M., Bachelart F., Imbrecht O., Lambert R. & Marcoen J.M. 2013. Contrôle de l'azote potentiellement lessivable dans le sol en début de période de lixiviation. Établissement des valeurs de référence, *BASE* [En

ligne], 17,(1), 231-236 URL : <https://popups.uliege.be:443/1780-4507/index.php?id=9716>.

- Van Evert F.K. et al. 2012. Using crop reflectance to determine sidedress N rate in potato saves N and maintains yield. *Eur J Agron*, 43, 58–67.
- Van Loon C.D., Slangen J.H.G. & Houwing J.H. 1987. Nitrate content of leaf petioles as a guide to optimization of N-fertilization of ware potatoes. In: *EAPR Abstracts of conference papers and posters of the 10th Triennial conference of the European Association for Potato Research*, Aalborg, Denmark, 146-147.
- Vos J. & Bom M. 1993. Hand-held chlorophyll meter: a promising tool to assess the nitrogen status of potato foliage. *Potato Res* , Vol. 36: 301-308.
- Vos J. 1999. Split nitrogen application in potato: effects on accumulation of nitrogen and dry matter in the crop and on the soil nitrogen budget. *J Agric Sci*, 133(3), 263-274.
- Vos J. & MacKerron D.K.L. 2000. Basic concepts of the management of supply of nitrogen and water in potato production. In: *Haverkort A.J., Mac Kerron D.K.L. (Eds.), Management of nitrogen and water in potato production*. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands, pp 15-33.
- Vos J. 2009. Nitrogen responses and nitrogen management in potato. *Potato Res* 52: 305–317.
- Westermann D.T. and Kleinkopf G.E. 1985. Nitrogen Requirements of Potatoes. *Agron J* 77:616-621.
- Young M. W., MacKerron, D. K. L. & Davies, H. V. 1997. Calibration of near infrared reflectance spectroscopy to estimate nitrogen concentration in potato tissues. *Potato Res*, 40(2), 215-220.

Chapitre 2

**La fluorescence chlorophyllienne pour
l'évaluation du statut azoté des cultures**

Chapitre 2. La fluorescence chlorophyllienne pour l'évaluation du statut azoté des cultures

Le chapitre 2 a pour but de démontrer, à partir des résultats de la littérature, l'intérêt de la mesure non invasive et rapide de la ChlF pour l'estimation du statut azoté de la biomasse végétale aérienne des cultures en plein champ.

Ce chapitre est présenté sous forme d'une revue bibliographique publiée en 2015 [Ben Abdallah F., Philippe W. & Goffart JP. 2016. *Utilisation de la fluorescence chlorophyllienne pour l'évaluation du statut azoté des cultures (synthèse bibliographique)*, BASE [En ligne], Volume 20, Numéro 1, 83-93 URL : <https://popups.uliege.be:443/1780-4507/index.php?id=12627>].

L'actualisation des connaissances depuis la publication de l'article est présentée en seconde partie de ce chapitre et prend en compte les avancées dans le domaine de la ChlF acquises au cours de la période entre 2015 et fin 2018.

1. *Utilisation de la fluorescence chlorophyllienne pour l'évaluation du statut azoté des cultures (synthèse bibliographique)*

Feriel Ben Abdallah, William Philippe, Jean-Pierre Goffart

Centre wallon de Recherches agronomiques. Département Productions et Filières. Unité Stratégies Phytotechniques. Rue du Bordia, 4. BE-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : f.benabdallah@cra.wallonie.be

Article publié dans BASE [En ligne], Volume 20, Numéro 1, 83-93 URL : <https://popups.uliege.be:443/1780-4507/index.php?id=12627>. Reçu le 23 avril 2015, accepté le 6 octobre 2015.

Introduction. La gestion optimale de la fertilisation azotée des cultures nécessite l'utilisation de méthodes qui permettent d'évaluer rapidement et avec précision le statut azoté de la biomasse aérienne en cours de saison. C'est le cas des mesures optiques sur le végétal et parmi celles-ci, les approches basées sur la mesure de la fluorescence chlorophyllienne (ChlF) des feuilles occupent une place intéressante. Les potentialités de la ChlF sont étudiées depuis plusieurs années pour détecter et quantifier différents stress biotiques et abiotiques des plantes et la ChlF peut s'envisager pour l'évaluation du statut azoté. Ces approches permettent *a priori* de pallier certaines limitations des méthodes souvent utilisées pour l'évaluation du statut azoté basées sur la transmission ou la réflexion de la lumière et reliées à la teneur en chlorophylle des feuilles.

Littérature. Dans cette revue, deux approches basées sur la ChlF sont examinées. La première étudie la ChlF variable, ou cinétique de Kautsky, qui représente l'approche classiquement abordée par la majorité des auteurs. La seconde approche repose sur l'estimation par la ChlF de la concentration en composés foliaires métabolites de la plante, plus spécifiquement la chlorophylle et les composés phénoliques (en particulier les flavonoïdes). Pour chaque approche, les caractéristiques de la ChlF sont examinées, expliquant leurs liens et leurs applications dans l'évaluation du statut azoté des cultures.

Conclusions. Parmi les deux approches analysées, l'utilisation du rapport de ChlF qui combine l'estimation de la concentration en chlorophylle et en flavonoïdes au niveau de la feuille apparaît comme une approche potentiellement pertinente pour évaluer le statut azoté des cultures, ces deux concentrations étant en relation étroite avec la teneur en azote des feuilles.

Mots-clés. Fluorescence, chlorophylle, composé phénolique, teneur en azote, état nutritionnel, nutrition foliaire.

Use of chlorophyll fluorescence for the evaluation of crops nitrogen status. A review

Introduction. Optimizing the nitrogen (N) fertilization of crops requires the use of methods that quickly and accurately assess the N status of aboveground biomass during the growing season. Optical measurements on plants allow the achievement of this goal and, among these approaches, the leaf chlorophyll fluorescence based method (ChlF) appears promising. The potential of ChlF has been studied for many years. The value of this method for detecting and quantifying various biotic and abiotic plant stresses has been assessed as well as its potential for the evaluation of crop N status (CNS). For this last application, ChlF could offer solutions to the limitations of the usual methods for evaluating CNS, which are based on light transmittance or reflectance and are related to leaf chlorophyll content.

Literature. In this report, two ChlF based approaches are reviewed. The first approach is variable ChlF, or Kautsky kinetics, which represents the approach taken in the majority of the published work examined in the field of ChlF. The second approach is based on ChlF sensing methods for the estimation of the concentration of leaf metabolite compounds in plants, particularly that of leaf chlorophyll and phenolic compounds (mainly flavonoids). The characteristics and the applications of these two fluorescence approaches are studied for their potential use for the in-season monitoring of CNS.

Conclusions. Of these two approaches, the use of the ratio of fluorescence combining the estimation of concentrations of leaf chlorophyll and flavonoid content appears to be a relevant potential method to assess CNS, as both concentrations are in close relationship with leaf N concentration.

Keywords. Fluorescence, chlorophylls, phenolic compounds, nitrogen content, nutritional status, foliar nutrition.

1.1. Introduction

La gestion optimale de la fertilisation azotée des cultures nécessite l'utilisation de méthodes optiques qui permettent d'évaluer rapidement et avec précision le statut azoté de la biomasse aérienne en cours de saison. Une carence en azote induit des changements de concentrations de certains pigments et métabolites foliaires affectant les propriétés optiques des feuilles, ces dernières pouvant être rapidement estimées par des mesures de transmittance, d'absorbance, de réflectance ou de fluorescence chlorophyllienne (ChlF). En situation de carence, la proportion de l'énergie lumineuse absorbée pour la photosynthèse et celles menant à la ChlF et à la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur sont modifiées, de même que les parts transmises et réfléchies de la lumière incidente. Cette revue de la littérature s'intéresse spécifiquement aux potentialités de la ChlF comme outil de gestion de la fertilisation

azotée des cultures. Pour situer le phénomène de ChlF d'une part et son intérêt pour évaluer le statut azoté de la biomasse végétale d'autre part, il est nécessaire de considérer d'abord le devenir d'une lumière incidente naturelle ou artificielle lorsqu'elle impacte le végétal. Cette lumière présente différentes possibilités d'évolution. Comme l'illustre la figure 3 pour le rayonnement solaire, une part importante de la lumière est absorbée par la chlorophylle contenue dans les chloroplastes, une autre est transmise et une troisième est réfléchiée. De la part absorbée, une petite fraction seulement rentre dans les processus photochimiques (en relation avec la photosynthèse), une fraction très importante se dissipe sous forme de chaleur et la fraction restante se dissipe via une émission de fluorescence dite chlorophyllienne. Ces proportions varient fortement, d'une part selon la composition chimique et physique des feuilles et d'autre part, selon la dynamique de régulation qui est fonction de l'intensité lumineuse absorbée.

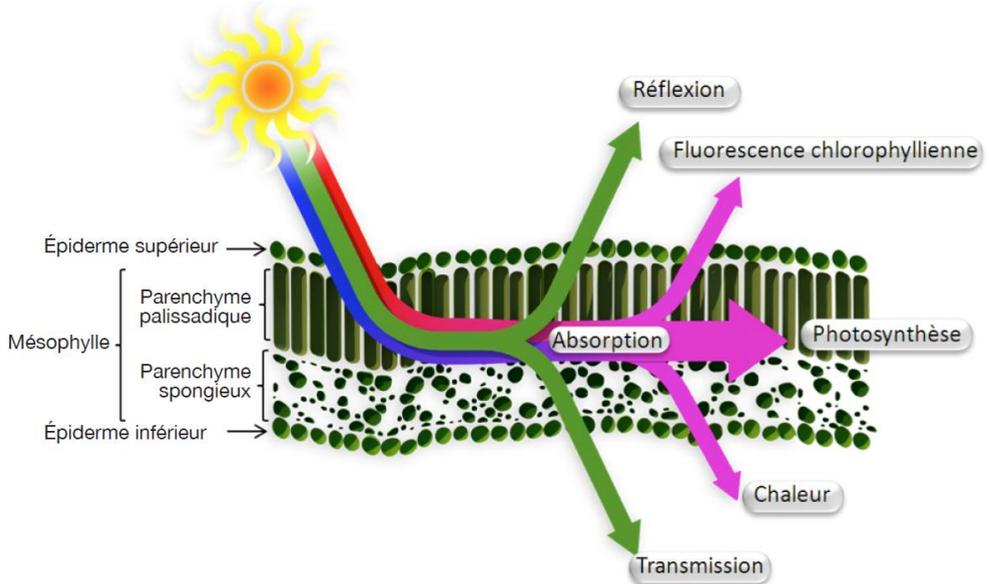


Figure 3. Représentation schématique du comportement du rayonnement solaire incident impactant la surface d'une feuille de dicotylédone dans le spectre visible — Schematic representation of the incident solar light behavior impacting a dicotyledonous leaf surface in the visible spectrum.

Sous faible intensité lumineuse, la majeure partie (plus de 80 %) de l'énergie absorbée va vers la photochimie et cette proportion diminue fortement sous de fortes intensités lumineuses, soit lorsque l'énergie absorbée excède la capacité d'assimilation de la photosynthèse. Le changement des caractéristiques spectrales des feuilles permet d'établir des indicateurs rapides et non destructifs de l'état nutritionnel en azote de la biomasse aérienne d'une culture. Les indicateurs liés à la concentration en chlorophylle des feuilles, par ses propriétés d'absorption, de réflexion et de fluorescence, occupent une place majeure. De nombreux auteurs ont mis en évidence la relation étroite entre les concentrations en azote et en

chlorophylle des feuilles (Vos et al., 1993 ; Blackmer et al., 1995). D'autres pigments foliaires en relation avec le statut azoté d'une culture peuvent également être estimés par la ChlF : il s'agit des composés phénoliques (les flavonoïdes en particulier).

Divers outils optiques ont déjà été étudiés ou sont en cours d'étude pour l'estimation du statut azoté de diverses cultures (Goffart et al., 2008; Tremblay et al., 2011; Muñoz-Huerta et al., 2013). Ces outils reposent sur des mesures non destructrices de transmission ou de réflexion des rayonnements lumineux par la biomasse en lien avec la concentration en chlorophylle des feuilles. Transmission (mesurée par des chlorophyllomètres) et réflexion (mesurée par des radiomètres) sont deux concepts qui sont exploités depuis des décennies pour la mise au point de méthodes rapides d'estimation du statut azoté des cultures (Blackmer et al., 1995; Denuit et al., 2002; Gianquinto et al., 2004). Les potentialités de la ChlF ont été explorées plus récemment dans cette même optique (Thoren et al., 2009; Zhang et al., 2010; Tremblay et al., 2012). Contrairement aux mesures de réflectance souvent utilisées, la ChlF, bien qu'ayant un signal relativement plus faible, possède l'avantage d'être spécifique à la plante par la caractérisation de l'activité photosynthétique (Buschmann, 2007) et de présenter une plus grande sensibilité, puisque le signal de fluorescence ne provient que des parties vertes du végétal (Lichtenthaler et al., 1988). Via les mesures de réflectance, il est aussi plus difficile de faire la distinction entre des variables corrélées telles que la biomasse et la teneur en azote (Thoren et al., 2009). Les mesures de transmittance à l'aide du chlorophyllomètre, quant à elles, détectent essentiellement des situations de déficience marquée en azote et pourraient présenter un retard de détection par rapport à l'entrée réelle en carence azotée (Tremblay et al., 2012).

La ChlF est aussi décrite comme étant une signature spectrale précoce pour détecter les carences en azote (Samson et al., 2000; Cadet, 2008). Ces auteurs décrivent que les variations de la ChlF induite sous ultra-violets (UV) suite à un stress azoté précèdent ou accompagnent l'inhibition de croissance. Sinclair et al. (2002) ont par ailleurs mis en évidence qu'en situation de carence azotée, la croissance est inhibée avant que la photosynthèse, liée à la concentration en chlorophylle des feuilles, ne soit affectée. Cadet (2008) en déduit que la ChlF induite sous UV et liée à l'accumulation des composés phénoliques permet une détection plus précoce d'une carence en azote de la plante que les détections basées sur les changements de réflectance ou de transmittance liés uniquement à la diminution de la concentration en chlorophylle des feuilles.

Les connaissances importantes acquises sur la ChlF combinées aux développements récents d'instruments miniaturisés et appropriés et de méthodologies adaptées ont augmenté les possibilités d'application de cette signature spectrale.

L'utilisation de la ChlF pour l'estimation du statut azoté des cultures repose sur deux approches. La première approche étudie la ChlF comme indicateur de l'activité photosynthétique des plantes, véritable carrefour sur lequel se répercute tout état de stress, en se basant sur la ChlF variable encore appelée cinétique de Kautsky. La seconde approche de la ChlF repose sur l'estimation des composés métabolites

foliaires de la plante, la chlorophylle et certains composés phénoliques, considérés comme des indicateurs intrinsèques potentiels pour l'évaluation du statut azoté des plantes.

Cette revue vise à présenter les principes de base des phénomènes de la ChlF pour les deux approches considérées, englobant les aspects physique, moléculaire et physiologique, et expliquant les liens et les applications de ces approches dans l'évaluation du statut azoté d'une biomasse végétale.

1.2. Méthodologie

Cette revue bibliographique a utilisé la base de données Bielefeld Academic Search Engine, le moteur de recherche Google scholar, les ressources documentaires disponibles dans les bibliothèques de Gembloux Agro-Bio Tech et les ressources électroniques disponibles dans les collections de l'Université de Liège. Les mots-clés suivants en français – et leur équivalent en anglais – ont été utilisés : fluorescence chlorophyllienne, fluorescence chlorophyllienne variable, chlorophylle, composés phénoliques, azote.

1.2.1. La fluorescence chlorophyllienne

Une molécule fluorescente, ou fluorophore, possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Dans le cas de figure de la molécule de chlorophylle, l'absorption d'un photon fait passer la molécule de chlorophylle d'un état énergétique fondamental S_0 à un état excité singulet S_1 ou S_2 , selon la longueur d'onde absorbée respectivement dans le rouge (R) ou dans le bleu (B) (Figure 4) (Huot et al., 2010). Cet état excité est très instable, nécessitant ainsi de restituer l'excédent d'énergie pour revenir à l'état initial. La ChlF correspond à une transition énergétique sous forme de photon entre S_1 et un des niveaux vibrationnels de l'état S_0 . La fluorescence est en compétition avec deux autres processus de désexcitation de l'énergie absorbée, la photochimie et la dissipation thermique (Krause et al., 1991). Le photon ainsi émis par fluorescence correspond à une énergie plus faible que le photon initialement absorbé induisant un déplacement du spectre de fluorescence vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre d'absorption (déplacement de Stokes). La fluorescence provient de la chlorophylle *a*, la chlorophylle *b* étant non fluorescente *in vivo* et détenant un rôle de pigment accessoire qui transmet l'énergie absorbée à la chlorophylle *a* (Cerovic et al., 1999).

La fluorescence est caractérisée par différentes variables. En général, la première approche étudie le rendement quantique de fluorescence qui est défini comme le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. La seconde approche étudie l'intensité de fluorescence pour une longueur d'onde qui est définie comme le nombre de photons émis par unité de temps.

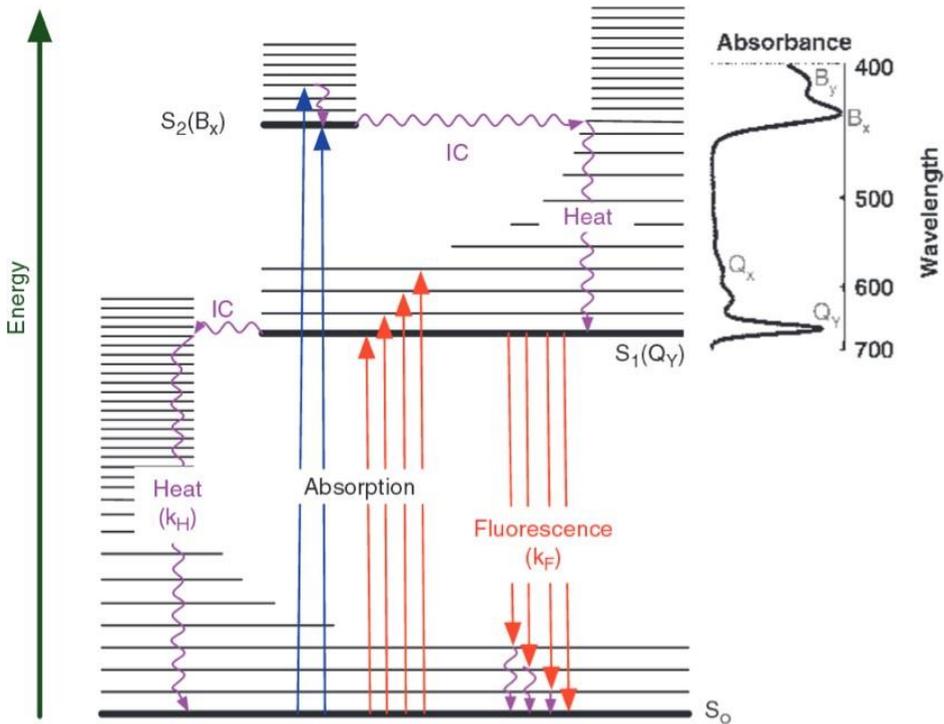


Figure 4. Diagramme d'énergie représentant l'état fondamental et les différents états excités pour la chlorophylle *a* (en solution). Spectre d'absorption de la chlorophylle *a* et bandes d'absorption (à droite) correspondant approximativement aux niveaux électroniques du diagramme — Diagram of energy of the fundamental state and the different excited states of chlorophyll *a*. Absorption spectrum of chlorophyll *a* with absorption bands approximately matched to the electronic levels (Huot et al., 2010).

Fluorescence chlorophyllienne variable. *In vivo*, le rendement de fluorescence varie de 0,5 à 3-5 % de la lumière absorbée (Krause et al., 1991). La variation du rendement de la fluorescence, également appelée cinétique de Kautsky, peut être expliquée par les mécanismes du quenching. Le quenching de la fluorescence est la diminution du rendement de la fluorescence déterminée d'une part par le quenching photochimique (qP), qui est l'utilisation de l'énergie d'excitation pour la photochimie au niveau des accepteurs d'électrons des centres réactionnels du photosystème II (PSII) et par le quenching non photochimique (qN) qui favorise la dissipation de l'énergie d'excitation par des mécanismes de perte de chaleur. Lorsque tous les centres réactionnels sont ouverts et, de ce fait, prêts à transférer l'énergie absorbée le long de la chaîne de transfert des électrons, le qP est à son maximum et le niveau minimal de la fluorescence (F_0) est observé (Figure 5).

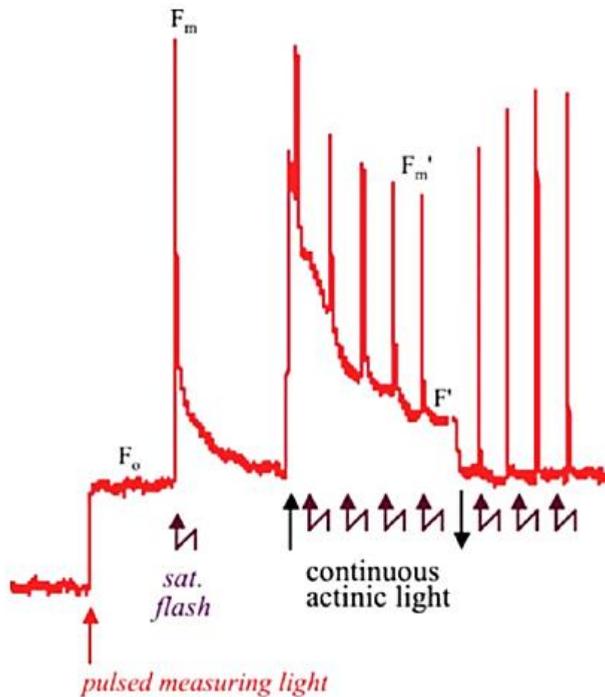


Figure 5. Paramètres de la fluorescence chlorophyllienne variable — Variable chlorophyll fluorescence parameters (Tremblay et al., 2012).

F_0 (niveau minimal de la fluorescence) et F_m (niveau maximal de la fluorescence) : paramètres de fluorescence pour des feuilles adaptées à l'obscurité; F_m' (niveau maximal de la fluorescence) et F' (niveau de la fluorescence observé à un temps t) : paramètres de fluorescence pour des feuilles adaptées à la lumière — F_0 (minimum fluorescence level) and F_m (maximum fluorescence level) are fluorescence parameters for dark adapted leaves. F_m' (maximum fluorescence level) et F' (fluorescence level observed at time t) are fluorescence parameters for light adapted leaves.

Ce niveau de fluorescence est généralement mesuré suite à une illumination de feuilles préalablement conditionnées à l'obscurité. Au contraire, lorsque tous les centres réactionnels sont fermés, le qP est à son minimum et le niveau maximal de la fluorescence (F_m) est atteint. Ce niveau F_m est mesuré sous lumière saturante. La différence entre F_0 et F_m est définie comme la fluorescence variable F_v . La fluorescence F_m diminue ensuite jusqu'au niveau F_s (suite à l'augmentation du qP et à l'induction du mécanisme du qN). L'excès d'énergie qui ne peut être utilisé pour la réaction photochimique est dissipé sous forme de chaleur. D'autres paramètres ont également été introduits par Genty et al. (1989). Il s'agit du niveau de fluorescence F' observé pour des feuilles adaptées à la lumière, du niveau F_m' lorsque les centres réactionnels du PSII sont fermés et du niveau F_v' pour la fluorescence variable au niveau de ces feuilles. Les rapports F_v/F_m et $(F_m' - F')/F_m'$ sont les paramètres les plus couramment utilisés pour la détection de divers types de stress au niveau de la plante. Le paramètre F_v/F_m est défini comme l'efficacité photochimique maximale du PSII (Butler, 1978). Pour une large gamme de plantes saines, le rapport F_v/F_m est

de 0,8 à 0,833 (Björkman et al., 1987). Le rapport $(F_m' - F') / F_m'$ est défini comme l'efficacité photochimique opérationnelle du PSII sous illumination (Genty et al., 1989). Les paramètres de fluorescence peuvent être utilisés pour évaluer les changements photochimiques du PSII, le flux linéaire d'électrons et l'assimilation du CO_2 in vivo (Baker, 2008).

Fluorescence chlorophyllienne et composés métabolites foliaires. La ChlF d'une feuille verte, à température ambiante, est caractérisée par une première bande étroite ayant un maximum d'émission dans la région R du spectre autour de 685-690 nm (fluorescence rouge ou *Red Fluorescence* : RF) et une deuxième bande plus large avec un maximum dans le proche infrarouge (PIR) autour de 730-740 nm (fluorescence du rouge lointain ou *Far Red Fluorescence* : FRF) (Buschmann, 2007). Bien qu'il existe une hétérogénéité de l'émission de fluorescence de la chlorophylle due à l'existence des deux photosystèmes, la fluorescence à température ambiante provient majoritairement du PSII (Krause et al., 1991). Seule une petite partie de la fluorescence dans le PIR vient du PSI. Les pics RF et/ou FRF permettent d'estimer la concentration en composés métabolites foliaires de la plante: la chlorophylle et certains composés phénoliques (les flavonoïdes en particulier). Pour estimer ces derniers, il est utile de considérer aussi la FRF sous excitation de rayonnements UV.

Rapport RF/FRF et concentration en chlorophylle des feuilles. À partir d'une faible concentration en chlorophylle des feuilles, la RF et la FRF augmentent avec la teneur en chlorophylle (Figure 6). À partir d'une teneur plus élevée en chlorophylle, la FRF augmente légèrement suite à une augmentation de la concentration en chlorophylle, alors que la RF se stabilise puis diminue (Buschmann, 2007).

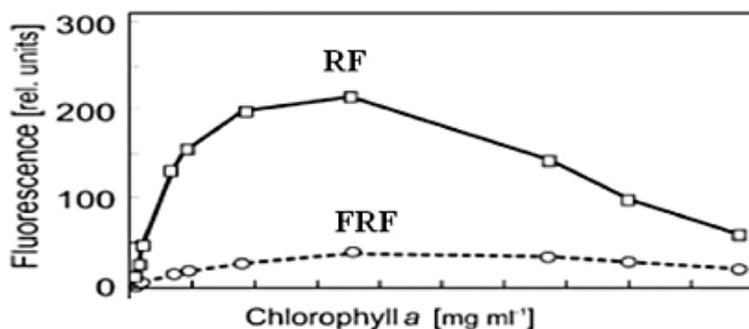


Figure 6. Évolution de l'intensité des fluorescences dans le rouge (RF) et dans le proche infrarouge (FRF) de la chlorophylle a isolée en fonction de la concentration de la solution en chlorophylle a (Buschmann, 2007 basé sur les travaux de Gitelson et al., 1998) — Changes in the intensity of the red (RF) and the far-red (FRF) chlorophyll fluorescence of isolated chlorophyll a in relation with chlorophyll a concentration of the solution (Buschmann, 2007 based on the work of Gitelson et al., 1998).

Cette réduction de la RF induite par l'accroissement de la concentration en chlorophylle est due au phénomène de réabsorption, par la chlorophylle, du spectre d'émission de la fluorescence au niveau des longueurs d'onde du R.

La figure 7 décrit le phénomène de réabsorption *in vivo* au niveau de la feuille, expliquant ainsi la différence d'allure observée entre le spectre d'émission (Figure 7a) et les spectres de détection de la ChlF (Figure 7d et 7e). La réabsorption est la conséquence du chevauchement du spectre d'émission de fluorescence dans la région du R (Figure 7b: spectre en rouge) avec le spectre d'absorption de la chlorophylle (Figure 7b: spectre en noir). Étant donné que le spectre d'absorption de la chlorophylle possède un pic dans le R (de l'ordre de 680 nm) qui diminue rapidement pour des plus grandes longueurs d'onde, la réabsorption de la FRF est faible, comparativement à la réabsorption de la RF (Buschmann, 2007).

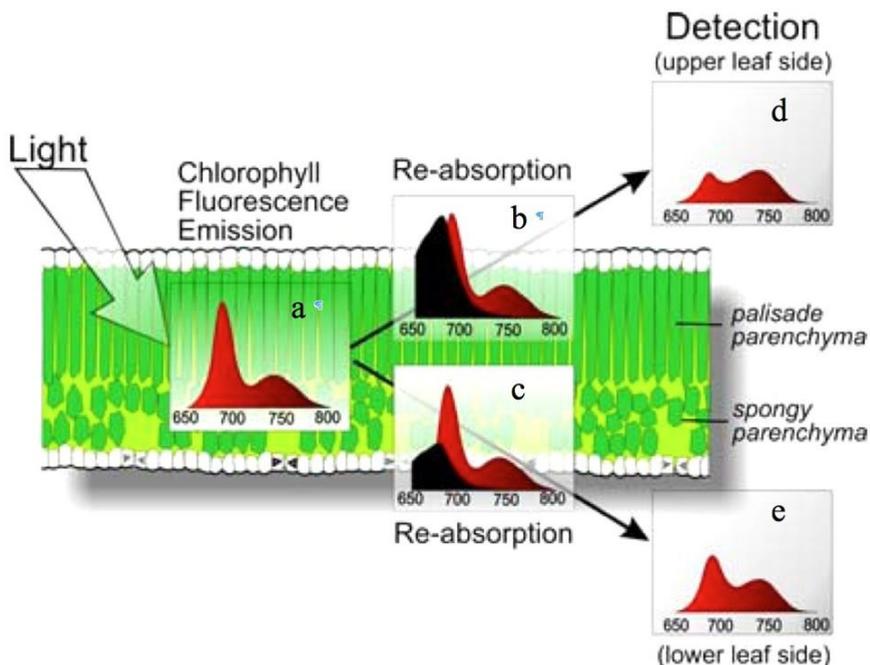


Figure 7. Spectres d'émission (a) et de détection (d, e) de la fluorescence chlorophyllienne (en rouge) et spectres de réabsorption de la chlorophylle (b, c en noir) émis *in vivo* au niveau d'une feuille bifaciale — Emission (a) and detection (d, e) of chlorophyll fluorescence spectrum (in red) and chlorophyll absorption spectrum (b, c in black) inside a bifacial leaf (Buschmann, 2007).

La différence de concentration en chlorophylle entre la face supérieure et inférieure des feuilles bifaciales induit un degré de réabsorption de la RF beaucoup plus important au niveau de la face supérieure (Figure 7b: spectre en noir) que de la face inférieure (Figure 7b: spectre en noir), ce qui explique la discrimination observée au niveau des spectres de détection de la RF et de la FRF selon la face considérée de la feuille (Figure 7d et 7e) (Buschmann, 2007).

La mesure de la fluorescence par son intensité est tributaire de facteurs externes tels que la distance, la transmission atmosphérique, la géométrie et les mouvements du couvert végétal, d'où le recours aux rapports d'émission de fluorescence ou rapports d'excitation de fluorescence (Lichtenthaler et al., 1990). La prise en considération des unités relatives permet également d'éliminer les variables de l'instrument utilisées telles que l'intensité de la lumière ou l'angle de détection (Buschmann, 2007).

Le rapport le plus souvent utilisé dans la littérature est le rapport RF/FRF, rapport entre deux intensités de fluorescence. La diminution de ce rapport avec l'augmentation de la concentration en chlorophylle est induite par le développement de l'épaule de la FRF et l'augmentation de la réabsorption qui affecte fortement la RF. Cette évolution du rapport en fonction de la concentration en chlorophylle a été observée et confirmée pour plusieurs espèces de plantes et sous diverses conditions (Lichtenthaler et al., 1988; Lichtenthaler et al., 1990; Gitelson et al., 1998).

Des résultats obtenus par Gitelson et al. (1998) démontrent que 90 % de la variation du rapport RF/FRF spécifique, F685/F735, est déterminée par le changement de la concentration en chlorophylle des feuilles. Le rapport F685/F735 possède une grande sensibilité pour des teneurs en chlorophylle faibles à modérées (valeur proche de 0 à 100-150 mg.m⁻²). Ce rapport sature ensuite, à partir des teneurs modérées à élevées en chlorophylle (Gitelson et al., 1999) et donc sa sensibilité devient relativement faible pour des teneurs en chlorophylle supérieures à 200 mg.m⁻² (Gitelson et al., 1998). Étant donné que le PSII définit le niveau de la ChlF variable et que sa contribution est plus importante au niveau du pic RF comparativement au pic FRF, le rapport RF/FRF peut être influencé par le rendement de la fluorescence variable, ce qui pourrait représenter une limitation dans l'interprétation de ce rapport. Le rapport RF/FRF est également influencé par la longueur d'onde de la source lumineuse utilisée et la température de la feuille (Agati et al., 1995). De ce fait, une standardisation de la méthode de mesure de ce rapport est nécessaire afin d'obtenir une information fiable. Selon Buschmann (2007), les valeurs des rapports F690/F740 ou encore F690/F735 dépendent essentiellement de la teneur en chlorophylle et, à un moindre degré, de l'activité photosynthétique et, dans une mesure relativement faible, des caractéristiques optiques de la feuille.

Rapport FRF-UV/FRF-R et concentration en composés phénoliques des feuilles. Parmi les composés phénoliques, les flavonoïdes et les acides hydroxycinnamiques, majoritairement présents dans l'épiderme des feuilles, ont la propriété d'absorber les rayonnements UV et donc d'agir comme un filtre UV, protégeant ainsi le mésophylle des feuilles. Bilger et al. (1997) ont proposé l'utilisation de la transmittance épidermique comme un outil d'estimation de la teneur en composés phénoliques absorbants dans l'UV. Day et al. (1994) ont montré une corrélation négative étroite entre l'absorbance UV des extraits de feuilles et la transmittance épidermique. Les travaux de Cerovic et al. (2002) ont démontré que le rapport FRF-UV/FRF-R est proportionnel à l'absorbance des UV par les composés phénoliques présents dans l'épiderme et donc à la concentration de ces derniers (Loi de Beer- Lambert). Ce

rapport de fluorescence FRF repose sur l'utilisation de deux longueurs d'onde d'excitation, l'une dans l'UV (-UV) et l'autre dans le rouge (-R). L'excitation UV (375 nm) est absorbée majoritairement par les flavonoïdes (les acides hydroxycinnamiques absorbant très peu à cette longueur d'onde), induisant ainsi une diminution de l'excitation UV qui atteint la chlorophylle du mésophylle et donc une diminution de la ChlF sous excitation UV (Figure 8). L'excitation R atteint intacte la chlorophylle du mésophylle, sans être absorbée par les composés phénoliques présents dans l'épiderme et induit une ChlF dans le PIR plus importante que celle observée suite à l'excitation UV. Cartelat et al. (2005) ont mis en évidence une relation linéaire étroite entre les flavonoïdes contenus au niveau des extraits de feuilles de blé (mesurés par absorbance) et le ratio FRF-UV/FRF-R.

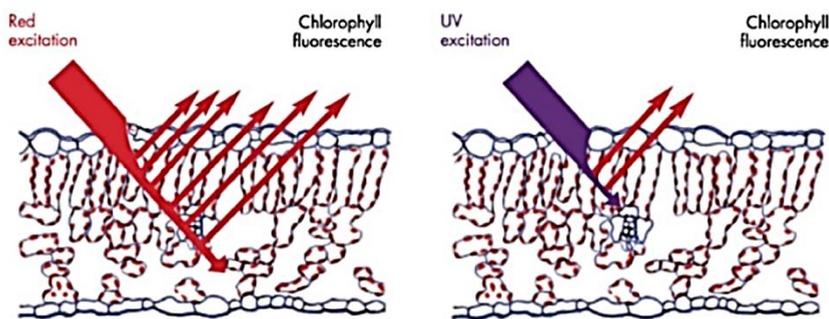


Figure 8. Principe de mesure de la fluorescence chlorophyllienne induite suite à une excitation UV et une excitation rouge — Measurement principle of chlorophyll fluorescence induced under UV and red excitation (Tremblay et al., 2012).

1.2.2. Fluorescence chlorophyllienne et évaluation du statut azoté des cultures

Utilisation de la fluorescence chlorophyllienne variable. Comme déjà mentionné, l'émission de la fluorescence est directement liée au processus photosynthétique de la plante. En particulier, les paramètres F_v/F_m et $(F_m' - F')/F_m'$ fournissent une estimation de l'efficacité photochimique du PSII. Étant donné que l'activité photosynthétique est reliée au statut azoté (Evans, 1989), ces paramètres de la ChlF peuvent être utilisés pour la détection d'un stress azoté. Sous l'action de stress, la photochimie est ralentie, induisant ainsi l'augmentation des rendements en fluorescence et en perte de chaleur (Henriques, 2009). Khamis et al. (1990) ont démontré que, sous forte intensité lumineuse, les apports d'azote modifient le paramètre F_v/F_m . Cependant, sous faible intensité lumineuse, le rapport F_v/F_m ne varie pas suite à une déficience en azote (Khamis et al., 1990 ; Ciompi et al., 1996). Le fluorimètre utilisé au niveau de ces deux études est le PAM (*Pulse Amplitude Modulated*, Walz, Allemagne) mesurant la fluorescence modulée après une période de conditionnement à l'obscurité des feuilles. La variation du ratio F_v/F_m en fonction de l'azote reflète probablement des réponses spécifiques aux conditions environnementales et à la dose d'azote pour les différentes espèces de plantes

considérées (Mauromicale et al., 2006). Les paramètres de la ChlF variable sont peu spécifiques, car variant selon l'activité photosynthétique qui, elle-même, est sensible à de nombreux facteurs environnementaux (notamment l'intensité lumineuse ambiante et la température). La nature dynamique de ces paramètres rend leur utilisation complexe et moins fiable pour l'évaluation du statut azoté des cultures. À l'inverse, les paramètres RF/FRF et FRF-UV/FRF-R de nature constitutive, variant directement selon la concentration en chlorophylle et en polyphénols, sont donc plus stables et peuvent s'envisager pour l'évaluation du statut azoté des cultures.

Utilisation du rapport RF/FRF. La concentration en chlorophylle de la feuille est positivement corrélée avec sa concentration en azote, étant donné que l'azote est le constituant majeur du noyau tétrapyrrole de la chlorophylle. Selon un large consensus, l'estimation de la concentration en chlorophylle au niveau des feuilles permet d'estimer le statut en azote de la biomasse d'une culture et *in fine* d'ajuster la dose optimale de la fertilisation azotée en cours de saison (Blakmer et al., 1995; Goffart et al., 2002; Gianquinto et al., 2004). Le ratio RF/FRF diminue avec l'augmentation des apports en azote (Schächtl et al., 2005; Thoren et al., 2009).

Les travaux de Schächtl et al. (2005) ont confirmé la potentialité de mesure du rapport RF/FRF pour la détection du statut azoté pour une culture de blé sous lumière ambiante et en plein champ. Le laser utilisé dans cette étude induit une excitation à 660 nm et mesure la fluorescence à 690 et 730 nm.

Le rapport F690/F730 mesuré sur culture de colza (*Brassica napus* L.) présente une corrélation étroite ($R^2 = 0,98$) avec la teneur en azote (Thoren et al., 2009). Dans cette étude, le Laser-N-detector (Planto GmbH, Leipzig, Allemagne) est embarqué sur le toit d'un tracteur avec une distance de 3-4 m entre le capteur et la plante.

Les rapports FRF-R/RF-R et FRF-V/RF-V, ratios de fluorescence induite respectivement sous excitation R à 635 nm (-R) ou excitation verte à 515 nm (-V) et mesurés sur des feuilles de maïs, sont fortement influencés par les doses d'azote appliquées (Zhang et al., 2010). L'appareil utilisé au niveau de cette étude est le fluorimètre Multiplex (Force-A, Orsay, Paris, France) mesurant par télédétection rapprochée la fluorescence des feuilles à 685 nm (RF) et à 735 nm (FRF).

Cependant, des facteurs autres que l'azote ont été identifiés comme agissant sur la photosynthèse et sur la teneur en chlorophylle. Ces facteurs, liés à la concentration en soufre par exemple (Samson et al., 2000) ou encore au régime hydrique (Gianquinto et al., 2004), montrent que les variations en chlorophylle ne sont pas exclusivement spécifiques au statut azoté de la culture. Ceci limite l'utilisation du rapport RF/FRF, relié à la concentration en chlorophylle, pour l'évaluation du statut azoté des cultures.

Utilisation du rapport FRF-UV/FRF-R. La teneur en composés phénoliques augmente en situation de déficit en azote. Chishaki et al. (1997) rapportent une augmentation notable de la concentration en composés phénoliques, tels que l'acide *p*-coumarique et de l'acide férulique, au niveau des plantes de riz (*Oryza sativa*) suite à une déficience en azote. Lea et al. (2007) rapportent une augmentation en

flavonoïdes (anthocyanines et flavonols) au niveau des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* provoquée par une déficience en azote. Une comparaison d'extraits de feuilles de tomates (*Lycopersicon esculentum*) d'un témoin non carencé en azote avec celles en condition de carence azotée a montré une augmentation des teneurs en flavonoïdes (anthocyanidines et flavonols glycosylés) pour les plantes en situation de déficit en azote (Bongue-Bartelsman et al., 1995). Les travaux réalisés par Stewart et al. (2001) montrent qu'une déficience en azote permet d'induire une augmentation en flavonols, contrairement à la déficience phosphatée qui n'est pas capable de provoquer cette réponse. L'apport d'azote supplémentaire diminue de manière significative les concentrations de l'acide chlorogénique et de la majorité des flavonols mesurées à partir des feuilles de pomme de terre (Mittelstraß et al., 2006). L'hypothèse de la balance carbone/nutriments (Coley et al., 1985), largement acceptée par plusieurs écologistes, pourrait présenter une interprétation physiologique de l'accumulation des composés phénoliques induite sous une carence en azote (Cerovic et al., 1999). Cette hypothèse soutient que lorsque la disponibilité des ressources devient un facteur limitant, la croissance des plantes est inhibée plus que la photosynthèse et l'excès de carbone est ainsi alloué à la synthèse de composés phénoliques par stimulation de la voie de l'acide shikimique (Mercure et al., 2004). Cette situation est généralement observée pour des plantes présentant une déficience en azote (Sinclair et al., 2002). Des travaux sur *Arabidopsis thaliana* ont révélé que la synthèse des flavonoïdes améliore la tolérance au manque d'azote (Peng et al., 2008).

Plusieurs études ont montré la potentialité d'utilisation du ratio FRF-UV/FRF-R pour la détection d'un stress azoté au niveau de la plante. Les résultats de Cartelat et al. (2005) ont confirmé que le ratio FRF-UV/FRF-R mesuré à partir du fluorimètre Dualex (Force-A, Orsay, Paris, France) est relié aux différents niveaux de fumure azotée. Dans cette étude, le ratio de fluorescence est corrélé négativement avec la teneur en azote au niveau des feuilles ($r = -0,87$). Selon Demotes- Mainard et al. (2008), le Dualex est un outil prometteur pour l'évaluation du statut azoté.

Selon Lillo et al. (2008), différents facteurs environnementaux interagissent en influençant les concentrations en flavonoïdes dans les plantes. Parmi les facteurs (azote, température et lumière) étudiés par Løvdaal et al. (2010), le déficit en azote est l'élément qui contribue le plus fortement à l'accumulation de flavonoïdes au niveau des feuilles de tomate. La déficience en soufre n'affecte pas la variation des composés phénoliques (Samson et al., 2000). Cependant, sous conditions de stress hydrique, les composés phénoliques augmentent au niveau des plantes déficientes (Estiarte et al., 1999 ; Fortier et al., 2006). Ainsi, l'accumulation des composés phénoliques peut être induite par plusieurs facteurs autres que l'azote, ce qui pourrait limiter l'utilisation du rapport FRF-UV/FRF-R dans le cadre de l'évaluation du statut azoté des cultures.

Les indices combinant sous forme de rapport les concentrations en chlorophylle et en flavonoïdes des feuilles ont également été étudiés en relation avec le statut azoté des cultures. Ce rapport est décrit comme étant un indicateur pertinent pour l'évaluation du statut azoté des plantes dans une optique de raisonnement des apports de la fertilisation azotée (Cerovic et al., 2002 ; Cartelat et al., 2005). Le

rapport [chlorophylle]/ [flavonoïdes] est un meilleur indicateur du statut azoté de la culture que la chlorophylle seule, car ce ratio est indépendant de la masse foliaire par unité de surface et permet d'étendre la gamme de discrimination pour les différents niveaux de fumure azotée testés en raison de la réaction inverse de la chlorophylle et des flavonoïdes vis-à-vis de l'azote (Cerovic et al., 2012 ; Agati et al., 2013). Ce rapport possède également l'avantage d'atténuer, au moins partiellement, l'hétérogénéité longitudinale dans la feuille (Cartelat et al., 2005).

Le rapport [chlorophylle]/[flavonoïdes] peut être calculé par l'utilisation du chlorophyllomètre combiné au Dualex (Cartelat et al., 2005 ; Demotes-Mainard et al., 2008) ou bien directement à partir de la nouvelle version du Dualex. Le fluorimètre Multiplex permet également de mesurer directement, à partir des signaux de fluorescence, un indice reliant la concentration en chlorophylle à la concentration en flavonoïdes. Il s'agit d'un rapport entre deux fluorescences FRF et RF émises respectivement sous deux excitations, l'une dans l'UV et l'autre dans le R. Un autre indice a également été proposé par Agati et al. (2013) pour la mesure combinée de la chlorophylle et des flavonoïdes : il s'agit du ratio de la fluorescence FRF, $(FRF-V.FRF-UV)/(FRF-R)^2$. Cet indice issu d'excitations sous trois longueurs d'ondes différentes (-V, -UV et -R) et calculé à partir des paramètres Multiplex a permis la discrimination entre tous les niveaux de fumure azotée testés.

1.3. Conclusions

Les caractéristiques et les applications de deux approches de la ChlF décrites dans la littérature ont été examinées pour l'évaluation du statut azoté d'une culture. La première approche qui étudie la ChlF variable, associée à l'état fonctionnel de l'appareil photosynthétique, permet d'identifier des paramètres de la cinétique de fluorescence qui nécessitent une adaptation des feuilles à l'obscurité, une température définie, une intensité de rayonnement déterminée et une durée d'éclairement spécifique. De ce fait, il s'agit d'une approche assez laborieuse et consommatrice en temps à mettre en œuvre en plein champ dans une optique opérationnelle fournissant une réponse rapide sur le statut azoté de la biomasse. D'autres instruments déjà commercialisés permettent également de mesurer des paramètres de la cinétique, mais sous lumière ambiante. L'étude de la cinétique de la fluorescence est la méthode de base au laboratoire, mais pour des raisons techniques elle est difficilement envisageable en application en plein champ. La nature dynamique des paramètres de la ChlF variable rend son application peu spécifique pour l'évaluation du statut azoté des cultures.

Au lieu de miser sur cette première approche des variations rapides de la ChlF, l'analyse spectrale de la ChlF émise par une feuille nous informe sur ses propriétés chimiques telles que les concentrations en chlorophylle et en composés phénoliques, reliées aux caractéristiques structurales de l'épiderme et du mésophylle. Cette seconde approche, de nature constitutive et donc plus stable, repose sur l'utilisation de rapport d'intensité de fluorescence, celle-ci correspondant au nombre de photons émis par unité de temps. La prise en considération des unités

relatives permet d'éliminer les variables de l'instrument utilisé (intensité de la lumière, angle de détection, etc.). Le rapport entre FRF et RF, respectivement les intensités d'émission de fluorescence dans le proche infrarouge et le rouge, qui fournit une estimation de la concentration en chlorophylle des feuilles, apparaît peu sensible à la surface foliaire et à la structure de la feuille (Buschmann, 2007). Cependant, la limitation majeure de l'utilisation de ce ratio est la variation du rendement de la fluorescence plus importante au niveau de RF qu'au niveau de FRF (Tremblay et al., 2012) suite au phénomène de réabsorption de la fluorescence dans le rouge. Ainsi, l'utilisation du ratio de la fluorescence FRF induite sous excitations UV et R, permettant l'estimation de la teneur en composés phénoliques (les flavonoïdes en particulier) au niveau de la feuille, serait plus adéquate dans une optique de monitoring du statut azoté d'une culture, car la variation du rendement de la fluorescence est la même pour les deux longueurs d'onde d'excitation. La ChlF induite sous UV est également décrite comme étant une signature précoce permettant la détection rapide d'une carence azotée.

Le rapport de fluorescence qui combine la concentration en flavonoïdes et en chlorophylle au niveau de la feuille présente un intérêt potentiel pour l'évaluation du statut azoté d'une culture. La prise en compte de la chlorophylle et des flavonoïdes améliore la sensibilité de ce rapport (Cartelat et al., 2005). En effet, la dépendance inverse de la chlorophylle et des flavonoïdes vis-à-vis du statut azoté accroît la discrimination entre les traitements azotés. Ce rapport possède également l'avantage d'atténuer, au moins partiellement, l'hétérogénéité longitudinale dans la feuille (Cartelat et al., 2005). Ce ratio a été proposé comme une solution afin de diminuer l'influence de la masse foliaire par unité de surface (Cerovic et al., 2012). La mesure de la fluorescence qui combine la concentration en flavonoïdes et en chlorophylle est effectuée par pincement de la feuille (cas du Dualex) ou par télédétection rapprochée à une distance de 10 cm entre la source de lumière et la surface de mesure (cas du Multiplex). Les surfaces foliaires respectives échantillonnées sont de 19-20 mm² et 50 cm², ce qui pourrait constituer une limitation pour une mise en œuvre opérationnelle en application agricole. Les versions embarquées attendues de tels systèmes positionnés à distance plus grande du végétal ouvriront la porte à ces perspectives opérationnelles. En raison de la faible spécificité de la chlorophylle et des composés phénoliques et des flavonoïdes en particulier pour l'évaluation du statut azoté de la culture, il apparaît utile de travailler avec des valeurs relatives des indicateurs par la prise en compte d'une fenêtre de référence (soit une fenêtre sans apport d'azote, soit une fenêtre sur-fertilisée) plutôt que des valeurs absolues.

Références bibliographiques

- Agati G., Mazzinghi P., Fusi F. & Ambrosini I., 1995. The F685/F730 chlorophyll fluorescence ratio as a tool in plant physiology: response to physiological and environmental factors. *J. Plant Physiol.*, 145(3), 228- 238.

- Agati G. et al., 2013. Fluorescence-based *versus* reflectance proximal sensing of nitrogen content in *Paspalum vaginatum* and *Zoysia matrella* turfgrasses. *Eur. J. Agron.*, 45, 39-51.
- Baker N.R., 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 89-113.
- Bilger W., Veit M., Schreiber L. & Schreiber U., 1997. Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant.*, 101, 754-763.
- Björkman O. & Demmig B., 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170, 489-504.
- Blackmer T.M. & Schepers J.S., 1995. Use of a chlorophyll meter to monitor nitrogen status and schedule fertigation for corn. *J. Prod. Agric.*, 8(1), 56-60.
- Bongue-Bartelsman M. & Phillips D.A., 1995. Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato plant. *Physiol. Biochem.*, 33, 539-546.
- Buschmann C., 2007. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynth. Res.*, 92(2), 261-271.
- Butler W.L., 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 29, 345-378.
- Cadet E., 2008. Détection et discrimination des carences en N, P et K par la fluorescence induite par UV chez le tournesol nain (*Helianthus annuus*, “Sunspot”). Mémoire : Université du Québec à Trois-Rivières (Canada).
- Cartelat A. et al., 2005. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crop Res.*, 91, 35-49.
- Cerovic Z.G. et al., 1999. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie*, 19, 543-578.

- Chishaki N. & Horiguchi T., 1997. Response of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 43, 987-991.
- Ciampi S., Gentili E., Guidi L. & Soldatini G.F., 1996. The effect of nitrogen deficiency on leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower. *Plant Sci.*, 118(2), 177-184.
- Coley P.D., Bryant J.P. & Chapin S., 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, 230, 895-899.
- Day T., Howells B.W. & Rice W.J., 1994. Ultraviolet absorption and epidermal-transmittance spectra in foliage. *Physiol. Plant.*, 92, 207-218.
- Demotes-Mainard S., Boumaza R., Meyer S. & Cerovic Z.G., 2008. Indicators of nitrogen status for ornamental woody plants based on optical measurements of leaf epidermal polyphenol and chlorophyll contents. *Sci. Hortic.*, 115(4), 377-385.
- Denuit J.P. et al., 2002. Management of nitrogen fertilization of winter wheat and potato crops using the chlorophyll meter for crop nitrogen status assessment. *Agronomie*, 22(7-8), 847-853.
- Estiarte M. et al., 1999. Free-air CO₂ enrichment of wheat: leaf flavonoid concentration throughout the growth cycle. *Physiol. Plant.*, 105(3), 423-433
- Evans J.R., 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia*, 78, 9-19.
- Fortier E. et al., 2006. Influence of irrigation and nitrogen fertilization on broccoli polyphenolics concentration. *Acta Hortic.*, 856, 55-62.
- Genty B., Briantais J.-M. & Baker N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 990, 87-92.
- Cerovic Z.G. et al., 2002. The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive *in situ* assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant Cell Environ.*, 25(12), 1663-1676.

- Cerovic Z.G., Masdoumier G., Ghozlen N.B. & Latouche G., 2012. A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiol. Plant.*, 146(3), 251-260.
- Gianquinto G. et al., 2004. The use of hand-held chlorophyll meters as a tool to assess the nitrogen status and to guide nitrogen fertilization of potato crop. *Potato Res.*, 47, 35-80.
- Gitelson A.A., Buschmann C. & Lichtenthaler H.K., 1998. Leaf chlorophyll fluorescence corrected for re-absorption by means of absorption and reflectance measurements. *J. Plant Physiol.*, 152, 283-296.
- Gitelson A.A., Buschmann C. & Lichtenthaler H.K., 1999. The chlorophyll fluorescence ratio F735/F700 as an accurate measure of the chlorophyll content in plants. *Remote Sens. Environ.*, 69, 296-302.
- Goffart J.-P., Olivier M., Destain J.-P. & Frankinet M., 2002. *Stratégie de gestion de la fertilisation azotée de la pomme de terre de consommation*. Gembloux, Belgique : Centre de Recherches agronomiques de Gembloux.
- Goffart J.-P., Olivier M. & Frankinet M., 2008. Potato crop nitrogen status assessment to improve N fertilization management and efficiency: past-present-future. *Potato Res.*, 51, 355-383.
- Henriques S., 2009. Leaf chlorophyll fluorescence: background and fundamentals for plant biologists. *Bot. Rev.*, 75, 249-270.
- Huot Y. & Babin M., 2010. Overview of fluorescence protocols: theory, basic concepts, and practice. In: Suggett D.J., Prášil O. & Borowitzka M.A., eds. *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 31-74.
- Khamis S., Lamaze T., Lemoine Y. & Foyer C., 1990. Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation relationships between electron transport and carbon assimilation. *Plant Physiol.*, 94(3), 1436-1443.
- Krause G.H. & Weis E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 313-349.

- Lea U.S., Slimestad R., Smedvig P. & Lillo C., 2007. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta*, 225, 1245-1253.
- Lichtenthaler H.K. & Rinderle U., 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 9(1), 29-85.
- Lichtenthaler H.K., Hak R. & Rinderle U., 1990. The chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 in leaves of different chlorophyll content. *Photosynth. Res.*, 25(3), 295-298.
- Lillo C., Lea U.S. & Ruoff P., 2008. Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell Environ.*, 31, 587-601.
- Løvdaal T. et al., 2010. Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry*, 71, 605-613.
- Mauromicale G., Ierna A. & Marchese M., 2006. Chlorophyll fluorescence and chlorophyll content in field-grown potato as affected by nitrogen supply, genotype, and plant age. *Photosynthetica*, 44(1), 76-82.
- Mercure S.A., Daoust B. & Samson G., 2004. Causal relationship between growth inhibition, accumulation of phenolic metabolites, and changes of UV-induced fluorescences in nitrogen-deficient barley plants. *Can. J. Bot.*, 82(6), 815-821.
- Mittelstraß K. et al., 2006. Modification of primary and secondary metabolism of potato plants by nitrogen application differentially affects resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Plant Biol.*, 8(5), 653-661.
- Muñoz Huerta R.F. et al., 2013. A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors*, 13(8), 10823-10843.
- Peng L. et al., 2008. An improved HPLC method for simultaneous determination of phenolic compounds, purine alkaloids and theanine in *Camellia* species. *J. Food Compos. Anal.*, 21(7), 559-563.

- Samson G. et al., 2000. Nutrient stress of corn plants: early detection and discrimination using a compact multiwavelength fluorescent lidar. *In: Proceedings of EARSeL-SIG-Workshop LIDAR, June 16-17, 2000, Dresden/FRG, Germany.*
- Schächtl J. et al., 2005. Laser induced chlorophyll fluorescence measurements for detecting the nitrogen status of wheat (*Triticum aestivum* L.) canopies. *Precis. Agric.*, 6, 143-156.
- Sinclair T.R. & Vadez V., 2002. Physiological traits for crop yield improvement in low N and P environments. *Plant Soil*, 245, 1-15.
- Stewart A.J. et al., 2001. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell Environ.*, 24(11), 1189-1197.
- Thoren D. & Schmidhalter U., 2009. Nitrogen status and biomass determination of oilseed rape by laser-induced chlorophyll fluorescence. *Eur. J. Agron.*, 30, 238-242.
- Tremblay N., Fallon E. & Ziadi N., 2011. Sensing of crop nitrogen status: opportunities, tools, limitations, and supporting information requirements. *Hortic. Technol.*, 21(3), 274-281.
- Tremblay N., Wang Z. & Cerovic Z.G., 2012. Sensing crop nitrogen status with fluorescence indicators. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 32(2), 451-464.
- Vos J. & Bom M., 1993. Hand-held chlorophyll meter: a promising tool to assess the nitrogen status of potato foliage. *Potato Res.*, 36, 301-308.
- Zhang Y. & Tremblay N., 2010. Evaluation of the Multiplex® fluorescence sensor for the assessment of corn nitrogen status. *In: Proceedings of the International Conference on Precision Agriculture, July 18-21, 2010, Denver, Colorado, USA.*

2. Actualisation sur les avancées dans le domaine de la fluorescence chlorophyllienne

La fluorescence de la chlorophylle *a* représente une des différentes voies de devenir de la lumière après son interception par une feuille. Les autres voies à savoir l'émission de chaleur et la photosynthèse (photochimie) permettent, parallèlement à la ChlF, la dissipation de l'énergie lumineuse absorbée. Ces voies de dissipation énergétique sont ainsi interdépendantes; un changement dans l'une des voies entraîne un changement dans les deux autres. C'est ce phénomène qui permet aux mesures de la ChlF d'être particulièrement utiles pour le suivi *in vivo* des plantes sous conditions de stress. Outre son utilité pour générer des informations sur l'activité photosynthétique et sur la productivité primaire brute, sa précocité de réponse face à des stress biotiques et abiotiques rend cette signature potentiellement intéressante pour la caractérisation du statut de santé de la végétation et/ou la résilience au stress (Drusch et al., 2017).

Les deux approches de ChlF examinées dans la revue précédente ont été abordées pour leur rôle dans l'évaluation du statut azoté des cultures en plein champ. Cette annexe présente les avancées majeures réalisées dans le domaine de la fluorescence depuis la réalisation de la revue en 2015 et en lien avec le statut azoté des plantes.

La première approche concerne la cinétique de la ChlF variable. Cette cinétique a été rapportée par Kautsky et al. (1931) qui ont observé que l'exposition à la lumière des feuilles, préalablement adaptées à l'obscurité, se caractérise par une augmentation rapide initiale de l'intensité de fluorescence (*la fluorescence rapide*) suivie d'une diminution lente jusqu'à un niveau minimum qui reste constant (*la fluorescence stationnaire*). Nous avons abordé, pour cette première approche, *la fluorescence rapide* et son rôle pour la détection des changements de l'état physiologique des plantes sous conditions de stress azoté. Les trois étapes fondamentales d'enclenchement de la photosynthèse; à savoir l'absorption de l'énergie lumineuse par un complexe d'antennes photocollectrices, le piégeage de la lumière par la chlorophylle du centre réactionnel et le transfert d'électrons (qui fait intervenir les deux photosystèmes PS I et PS II), sont liées au statut azoté de la culture et peuvent être quantifiées en mesurant la ChlF. Dans la revue présentée, nous avons évoqué différents paramètres de *la fluorescence rapide*. Le paramètre F_0 correspond au rendement minimal de fluorescence pour des feuilles adaptées à l'obscurité. Le paramètre F_m représente le rendement maximal de la fluorescence mesurée sous lumière saturante. La différence entre F_0 et F_m définit la fluorescence variable F_v et le rapport F_v/F_m définit l'efficacité photochimique maximale du PSII.

La ChlF variable a été longuement étudiée ces dernières années. En prenant en compte *la fluorescence rapide*, Jin et al. (2015) ont montré que le rapport F_v/F_m mesuré sur maïs augmente avec l'augmentation des doses d'azotes testées en accord avec les résultats de Khamis et al. (1990) cités dans la revue précédente. Cependant, les travaux de Živčák et al. (2015) ont montré que le paramètre de fluorescence usuellement utilisé F_v/F_m et mesuré sur blé est peu sensible au facteur azote,

contrairement aux indices PI_{abs} (index de performance pour l'activité photochimique) et PI_{tot} (index de performance totale pour l'activité photochimique) qui répondent de manière significative aux différents traitements azotés. Le PI est un indice global complexe communément appelé index de vitalité qui intègre le rendement des différentes étapes des réactions photochimiques (absorption, piégeage de l'énergie lumineuse et transfert d'électrons). En particulier, le PI_{abs} introduit par Strasser et al. (2000) est le produit de trois paramètres indépendants combinant des critères structuraux et fonctionnels : densité des centres réactionnels, l'efficacité de la photochimie et la conversion de l'énergie d'excitation dans le transport des électrons. Le PI_{tot} , introduit par Smit et al. (2009), est basé sur le PI_{abs} et correspond à la conservation de l'énergie à partir des photons absorbés par PSII jusqu'à la réduction des accepteurs finaux du PSI. Le PI_{abs} détermine les altérations de la cinétique rapide de la ChlF et particulièrement entre F_0 et F_m . Selon Banks (2017), le PI_{abs} fournit plus d'informations que les paramètres contenant uniquement des combinaisons de F_0 et F_m . L'utilisation de paramètres intégratifs tels que le PI est décrit comme étant plus pertinent comparativement aux paramètres biophysiques complexes qui nécessitent une compréhension profonde des processus photochimiques afin d'être interprétés correctement (Kalaji et al., 2016).

Toujours concernant la première approche de fluorescence, la *fluorescence stationnaire* (F_s) ou « steady state » qui traduit l'activité photosynthétique stable (après 5 à 10 min d'illumination sous une certaine intensité lumineuse) connaît ces dernières années un essor important. La F_s (qui n'est pas prise en compte au niveau de la revue présentée) peut être mesuré soit par des méthodes actives de fluorescence (tel que la méthode Pulse Amplitude Modulated) qui utilisent une lumière artificielle pour exciter la feuille, soit par des méthodes passives de fluorescence qui utilisent comme source d'excitation la lumière solaire. Les méthodes passives exploitent des zones du spectre solaire pour s'affranchir de la difficulté de mesurer la fluorescence sous lumière ambiante qui est très faible par rapport au flux réfléchi. Il s'agit de zones spectrales dans lesquelles le flux lumineux venant du soleil a été absorbé par les composés de l'atmosphère solaire ou terrestre et dans lesquelles la fluorescence émise par la végétation n'est pas négligeable devant le flux réfléchi. Les bandes telluriques d'absorption de l'oxygène (les bandes O_2 -B et O_2 -A centrées à 687 nm et 760 nm respectivement) et les raies de Fraunhofer sont fréquemment exploitées pour la mesure de la fluorescence passive induite par le rayonnement solaire (Joiner et al., 2016).

Il est possible d'estimer la F_s à l'échelle de la feuille, du couvert végétal et plus récemment, à l'échelle spatiale sur un territoire donné en se basant sur des données satellitaires (mesures extraites de satellites non destinés à l'origine pour la mesure de la fluorescence). Les efforts de recherche se sont naturellement tournés vers les techniques de mesure passive depuis l'avènement des satellites qui permettent l'extraction des mesures de fluorescence à l'échelle spatiale. La méthode passive de la fluorescence induite par le rayonnement solaire a été exploitée majoritairement dans le cadre de la mission d'exploration de la fluorescence FLEX (FLUorescence EXplorer) de l'agence spatiale européenne qui est encore dans sa phase d'étude (lancement prévu en 2022) et qui vise à utiliser la fluorescence à l'échelle

satellitaire. La plupart des articles publiés dans le domaine de la fluorescence induite par le rayonnement solaire exploitent les bandes d'absorption dans le proche infrarouge (Rossini et al., 2015 ; Joiner et al., 2016). Les travaux de Rossini et al. (2015) ont montré qu'il est possible d'estimer également la fluorescence rouge à partir d'une plate-forme aéroportée. Cendredro-Mateo et al. (2015) ont conclu que les méthodes actives et passives de la F_s sont hautement corrélées aux traitements azotés aussi bien à l'échelle foliaire qu'à l'échelle du couvert végétal mesurés pour une culture de blé.

Bien que la cinétique de ChlF variable soit décrite comme un outil utile pour évaluer les effets physiologiques de la déficience en azote au niveau des plantes, des données supplémentaires sont nécessaires pour démontrer l'intérêt de la fluorescence pour l'évaluation de la performance photosynthétique des plantes dans des essais au champ recevant différents apports azotés (Živčák et al., 2015). Les relations complexes entre la cinétique de fluorescence, l'état de stress et les variations naturelles au niveau de la plante ne sont pas suffisamment bien appréhendées pour permettre d'utiliser la ChlF comme méthode de référence pour des stress spécifiques dans les conditions de plein champ (Kalaji et al., 2014). Ces conclusions sont en accord avec les limitations décrites dans la revue présentée et qui traduisent les difficultés de mesurer les paramètres de la cinétique de la ChlF variable en plein champ et leurs faibles spécificités pour l'évaluation du statut azoté des cultures.

Concernant la seconde approche de la fluorescence mesurée par des rapports de fluorescence, des travaux récents ont confirmé les potentialités décrites pour l'estimation des métabolites foliaires et particulièrement l'intérêt des flavonoïdes seuls ou combinés à la chlorophylle pour l'évaluation du statut azoté des cultures.

Selon Joiner et al. (2016) combiner la ChlF mesurée dans le rouge et le proche infrarouge permet d'offrir des informations supplémentaires comparativement à la mesure de la fluorescence dans une longueur d'onde unique. Les travaux de Jia et al. (2018) sur le blé ont montré que le ratio de fluorescence, mesuré dans le rouge et le proche infrarouge par la méthode passive de fluorescence à l'échelle foliaire et en relation avec la teneur en chlorophylle, permet la détection de la teneur en azote des feuilles. Comparativement aux indices uniques de fluorescence, ce rapport montre une meilleure performance de détection de la teneur en azote de la feuille (Jia et al., 2018).

Les résultats préliminaires sur riz ont indiqué que les rapports de fluorescence (mesurée par le Multiplex) sont affectés de manière significative par les différents niveaux de fertilisation azotée testés (Huang et al., 2017). Ces rapports de fluorescence reliés soit à la teneur en chlorophylle (rapport mesuré dans le rouge et le proche infrarouge sous excitation rouge ou verte), soit à la teneur en flavonoïdes (rapport mesuré dans le proche infrarouge sous excitations UV et rouge), ou encore à la teneur en chlorophylle et en flavonoïdes (rapports mesurés dans le rouge et proche infrarouge sous excitations UV et rouge ou UV et verte) sont fortement corrélés avec le statut azoté de la plante (Huang et al., 2017).

Dans notre revue, l'approche de la fluorescence liée à l'accumulation des composés phénoliques est décrite comme étant une signature spectrale précoce pour

détecter les carences en azote. Longchamps et al. (2014) ont également démontré que les rapports de fluorescence (mesurée par le Multiplex), liés à la teneur en chlorophylle et en flavonoïdes, permettent de détecter le statut azoté du maïs à un stade précoce de la culture.

Contrairement aux mesures de la fluorescence variable et particulièrement aux mesures de la fluorescence stationnaire qui sont sensibles aux changements diurnes, le rapport de fluorescence reliée à la teneur en flavonoïdes au niveau des feuilles ne présente pas de variation à l'échelle journalière (Cartelat et al., 2005 ; Zhang et al., 2012). Les mesures de fluorescence reliée à la teneur en flavonoïdes peuvent donc être utilisées sans restriction par rapport à l'heure de mesure (Padilla et al., 2018).

Comme déjà mentionnée dans notre revue précédente, la teneur en flavonoïdes au niveau des feuilles augmente en réponse à d'autres facteurs de stress tels que le stress hydrique (Estiarte et al., 1999 ; Fortier et al., 2006). En culture de pomme de terre, nous avons observé que contrairement à la chlorophylle, la teneur en flavonoïdes mesurée par ChlF n'est pas sensible au stress hydrique (essais menés au CRA-W dans le cadre du projet PotFluo, projet SPW 2012-2018) (Ben Abdallah et al., 2017). Cette différence de réponse peut être liée au degré de stress et à des réactions physiologiques des plantes spécifiques à chaque culture suite au stress hydrique.

Les travaux de Gabriel et al. (2017) ont soutenu l'intérêt de la prise en compte de la ChlF pour le monitoring du statut azoté du maïs par la mesure combinée des flavonoïdes et de la chlorophylle. Contrairement aux indices uniques, de chlorophylle et de flavonoïdes, présentant une tendance qui sature pour des niveaux de fertilisation azotée élevés, l'indice combinant flavonoïdes et chlorophylle montre une relation linéaire avec les niveaux de fertilisation azotée testés. Ce facteur est déterminant pour définir si une culture est en situation de déficience ou de suffisance en azote (Gabriel et al. 2017).

Ainsi, suite aux derniers développements publiés, les conclusions de notre revue portant sur l'utilisation de la seconde approche de la ChlF pour l'évaluation du statut azoté des cultures et présentant l'intérêt des indicateurs phénoliques seuls ou combinés à la teneur en chlorophylle sont confirmées comme pertinentes dans le cadre de l'évaluation du statut azoté des cultures. Il est à noter que les travaux réalisés et qui sont en accord avec nos conclusions se sont intéressés à des cultures comme le blé ou le riz ; en culture de pomme de terre, à notre connaissance, aucune étude portant sur la fluorescence active et reliée aux indicateurs phénoliques n'a été réalisée, ce qui permet de maintenir l'originalité de cette thèse.

Références bibliographiques

- Banks J.M. 2017. Continuous excitation chlorophyll fluorescence parameters: a review for practitioners, *Tree Physiol*, 37(8) 1128–1136, <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx059>.
- Ben Abdallah F., Philippe W., Goffart J.P. 2017. Nitrogen and water effects on the performance of crop sensors for in season nitrogen management in potato crop. Poster presented at EAPR on 9-14 July 2017. Versailles, France.
- Cartelat A. et al. 2005. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum*L.). *Field Crop Res*, 91, 35-49.
- Cendrero-Mateo M.P. et al. 2015. Plant chlorophyll fluorescence: active and passive measurements at canopy and leaf scales with different nitrogen treatments. *J Exp Bot*, 67(1), 275-286.
- Drusch M. et al. 2017. The Fluorescence EXplorer (FLEX) Mission Concept- ESA's EarthExplorer 8 (EE8), *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens*, 55, 1273–1284
- Estiarte M. et al. 1999. Free-air CO₂ enrichment of wheat: leaf flavonoid concentration throughout the growth cycle. *Physiol Plant*, 105(3), 423-433.
- Fortier E. et al. 2006. Influence of irrigation and nitrogen fertilization on broccoli polyphenolics concentration. *Acta Hort*, 856, 55-62.
- Gabriel J. L. et al. 2017. Airborne and ground level sensors for monitoring nitrogen status in a maize crop. *Biosys Eng*, 160, 124-133.
- Huang S. et al. 2017. Proximal fluorescence sensing for in-season diagnosis of rice nitrogen status. *Adv Anim Biosci*, 8(02), 343–348. doi:10.1017/s2040470017000280.
- Jia M. et al. 2018. Difference and Potential of the Upward and Downward Sun-Induced Chlorophyll Fluorescence on Detecting Leaf Nitrogen Concentration in Wheat. *Remote Sens*, 10, 1315.
- Jin X., Yang G., Tan C. & Zhao C. 2015. Effects of nitrogen stress on the photosynthetic CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence, and sugar-nitrogen ratio in corn. *Sci Rep*, 5, 9311.

- Joiner J., Yoshida Y., Guanter L., & Middleton E. M. 2018. New methods for the retrieval of chlorophyll red fluorescence from hyperspectral satellite instruments: simulations and application to GOME-2 and SCIAMACHY. *Atmos Meas Tech*, 9(8).
- Kalaji H. M. et al. 2016. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(4), 102.
- Kalaji H. M. et al. 2014. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynth Res*, 122(2), 121-158.
- Kautsky H., & Hirsch A. 1931. Neue Theorie zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissen*, 19, 964.
- Khamis S., Lamaze T., Lemoine Y., & Foyer C. 1990. Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation: relationships between electron transport and carbon assimilation. *Plant Physiology*, 94(3), 1436-1443.
- Longchamps, L. & Khoslaa, R. 2014. Early Detection of Nitrogen Variability in Maize Using Fluorescence. *Agron J.* 106. 511-518. 10.2134/agronj2013.0218.
- Padilla F. et al. 2018. Proximal Optical Sensors for Nitrogen Management of Vegetable Crops: A Review. *Sensors*, 18(7), 2083.
- Rossini M. et al. 2015. Red and far red sun-induced chlorophyll fluorescence as a measure of plant photosynthesis. *Geophys Res Lett*, 42(6), 1632-1639.
- Strasser R.J., Srivastava A. & Tsimilli-Michael M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M., Pathre U., Mohanty P. (eds.): *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Taylor and Francis, London: 445-483.
- Smit M.F. et al. 2009. Effect of trifluoroacetate, a persistent degradation product of fluorinated hydrocarbons, on *Phaseolus vulgaris* and *Zea mays*. *Plant Physiology Biochem*, 47: 623-634.

Zhang Y., Tremblay N. & Zhu, J. 2012. A first comparison of Multiplex® for the assessment of corn nitrogen status. *J. Food. Agric. Environ*, 10(1), 1008-1016.

Živčák M. et al. 2015. Application of chlorophyll fluorescence performance indices to assess the wheat photosynthetic functions influenced by nitrogen deficiency. *Plant Soil Environ*, 60(5),210-215.

3. Lien avec le chapitre suivant

Dans le chapitre 2, deux approches basées sur la ChlF sont examinées. La première approche, classiquement abordée par la majorité des auteurs, étudie la ChlF variable, ou cinétique de Kautsky comme une sonde de l'activité photosynthétique de la plante. La seconde approche repose sur l'estimation par la ChlF de la concentration en composés foliaires, plus spécifiquement la chlorophylle et les composés phénoliques (la classe des flavonoïdes).

La ChlF apparaît comme une signature spectrale prometteuse pour la détection du statut azoté des cultures en plein champ. Cependant, l'analyse spectrale de la seconde approche de la ChlF émise par une feuille, reliée aux caractéristiques structurales de l'épiderme et du mésophylle et permettant l'estimation des métabolites foliaires, semble plus intéressante que la variation de la cinétique de la ChlF reliée à l'activité photosynthétique des plantes. Cette seconde approche, de nature constitutive et donc plus stable, repose sur l'utilisation de rapports de fluorescence.

Dans une optique d'une évaluation du statut azoté de la culture en cours de saison, l'utilisation du rapport de la ChlF du proche infrarouge, induite sous excitations UV et rouge, en relation avec l'estimation de la teneur en flavonoïdes au niveau de la feuille serait en particulier plus adéquat considérant les potentialités recherchées des indicateurs du statut azoté.

Justesse des mesures. Le rapport de ChlF, qui repose sur l'estimation des indicateurs flavonoïdes (seuls ou combinés à la teneur en chlorophylle), est corrélé négativement avec la teneur en azote au niveau des feuilles et pourrait donc être utilisé pour mesurer indirectement le statut azoté de la culture.

Précocité de détection. Cette approche de la ChlF relative à l'accumulation des flavonoïdes au niveau des feuilles de plantes carencées en azote est également décrite comme étant une signature précoce permettant la détection rapide d'une carence azotée.

Sensibilité des mesures. La ChlF liée à l'estimation des indicateurs flavonoïdes permet la discrimination entre les niveaux de fertilisation azotée testés. Le rapport de ChlF qui combine la concentration en flavonoïdes et en chlorophylle au niveau de la feuille présente un intérêt potentiel pour l'évaluation du statut azoté d'une culture. La prise en compte de la chlorophylle et des flavonoïdes améliore la sensibilité de ce rapport. En effet, la dépendance inverse de la chlorophylle et des flavonoïdes vis-à-vis du statut azoté accroît la discrimination entre les traitements azotés. Contrairement aux indices chlorophylle et flavonoïdes présentant une tendance qui sature pour des niveaux de fertilisation azotée élevés, l'indice combinant flavonoïdes et chlorophylle montre une relation linéaire avec les niveaux de fertilisation azotée testés.

Influence de différents facteurs sur les mesures de la ChlF. Contrairement au rapport de ChlF liée à la teneur en chlorophylle, le rapport lié à la teneur en

flavonoïdes n'est pas influencé par la variation du rendement de ChlF liée à la réabsorption. La mesure de fluorescence induite sous UV est également plus stable à l'échelle journalière, comparativement aux valeurs de la ChlF variable sensibles aux changements diurnes. Le rapport de ChlF qui combine la concentration en flavonoïdes et en chlorophylle au niveau de la feuille possède également l'avantage d'atténuer, au moins partiellement, l'hétérogénéité longitudinale dans la feuille. Ce rapport a été proposé comme une solution afin de diminuer l'influence de la masse foliaire par unité de surface.

À partir de ce chapitre, nous avons ainsi présenté l'intérêt de la prise en compte de la mesure active de la ChlF induite sous UV et reliée aux indicateurs flavonoïdes seuls ou combinés à la teneur en chlorophylle des feuilles, pour plusieurs cultures (par exemple le maïs, le tournesol, et le blé). Cependant, les avantages de la signature de la ChlF et la relation entre les flavonoïdes et le statut azoté de la biomasse aérienne n'ont pas été testés en culture de pomme de terre en plein champ. L'intérêt de la prise en compte de cette signature dans le cadre d'une évaluation du statut azoté en culture de pomme de terre réside dans ses potentialités décrites et particulièrement sa réponse précoce et sensible. D'une part, le critère de précocité pour une culture à cycle de croissance court et ayant une période brève de prélèvement de l'azote est particulièrement important puisque la détection et la correction du statut azoté en pomme de terre doivent être réalisées assez tôt en saison, entre 20 et 55 JAE, sans porter de préjudices au rendement. D'autre part, contrairement aux indicateurs chlorophylle, qui sont souvent utilisés dans le cadre de l'évaluation du statut azoté en pomme de terre et qui montrent une tendance qui sature pour des niveaux de fertilisation azotée élevés, les indicateurs de ChlF combinant flavonoïdes et chlorophylle permettent la discrimination entre les divers niveaux de fertilisation azotée.

Ainsi, au niveau des chapitres suivants, les essais menés se concentrent sur la culture de pomme de terre en relation avec l'évaluation de son statut azoté. Le chapitre 3 considère une base indispensable de la thèse qui est l'établissement de la courbe critique de dilution de l'azote pour la variété Bintje en Belgique. Cette courbe permet de définir la méthode de référence pour l'évaluation du statut azoté de la culture et la détermination du statut azoté optimal de la biomasse.

Chapitre 3

**La courbe critique de dilution de l'azote et
l'indice de nutrition azotée**

Chapitre 3. La courbe critique de dilution de l'azote et l'indice de nutrition azotée

Le chapitre 3 a pour but de définir la méthode de référence en matière d'évaluation du statut azoté de la culture spécifiquement pour la culture de pomme de terre dans les conditions belges. L'indice de nutrition azotée (INN) représente l'indicateur de référence en matière d'évaluation du statut azoté de la culture et qui permet de définir l'optimum azoté de la biomasse. Au départ de cette approche invasive, l'INN est calculé grâce à la courbe critique de dilution de l'azote. L'établissement de la courbe de dilution de l'azote en Belgique pour la culture de pomme de terre est présenté au niveau de l'article publié : [Ben Abdallah F. , Olivier M. , Goffart J.P. & Minet O. 2016. *Establishing the Nitrogen Dilution Curve for Potato Cultivar Bintje in Belgium. Potato research*, 59: (3), 241-258].

La définition de la méthode de référence permettra ultérieurement de vérifier la justesse des méthodes indirectes de ChlF liée à l'estimation de la teneur en flavonoïdes des feuilles pour l'évaluation du statut azoté de la culture.

1. Establishing the Nitrogen Dilution Curve for Potato Cultivar Bintje in Belgium

F. Ben Abdallah^{1*} & M. Olivier¹ & J. P. Goffart¹ & O. Minet²

* F. Ben Abdallah f.benabdallah@cra.wallonie.be

¹Production and Sectors Department, Crops Production Systems Unit, Walloon Agricultural Research Centre (CRA-W), Gembloux, Belgium

²Valorisation of Agricultural Products Department, Food and Feed Quality Unit, Walloon Agricultural Research Centre (CRA-W), Gembloux, Belgium

Received: 11 March 2016 / Accepted: 27 September 2016 / Published online: 20 October 2016

Potato Research (2016) 59:241-258.DOI 10.1007/s11540-016-9331-y.

Abstract. The nitrogen nutrition index (NNI) is recognized as a reliable plant-based method for diagnosing the crop nitrogen status (CNS). The NNI is based on the concept of critical nitrogen (N_c) dilution curve describing the N_c concentration in the whole plant as a function of the total crop biomass (W). The objectives of this study were (i) to establish the specific potato N_c dilution curve for cv. Bintje under Belgian growing conditions; (ii) to assess if the established curve for cv. Bintje could be used for cv. Charlotte; (iii) to compare the established curve with the existing N_c potato curves; and (iv) to assess the possibility of using the obtained N_c curve to evaluate the potato CNS and to predict the final yield. Field experiments studying increasing nitrogen (N) rates were conducted at different locations in Belgium for several years. Biomass N concentration and W production were determined at different sampling dates, and the final tuber yield was determined at harvest. At a sampling date, the N_c was determined by selecting the data point from the treatment presenting the highest W . The NNI was calculated as the ratio between the measured N concentration in W and the predicted N_c according to the N_c dilution curve. The N_c curve (N_c (%) = $5.37 W^{-0.45}$) was developed for potato for cv. Bintje under Belgian conditions matching also for cv. Charlotte. The Belgian N_c curve presented similar values as the curves developed previously in Scotland and the Netherlands. NNI was related to relative tuber yield (ratio between the tuber yield obtained for a given N rate and the highest tuber yield obtained among all N application rates). The N_c curve and the NNI adequately identified situations of limiting and non-limiting N nutrition and could be used to establish the potato CNS and to predict the final yield.

Keywords. Critical nitrogen dilution curve. Crop nitrogen status. Nitrogen nutrition index. Plant-based method. Potato

Abbreviations.

CNS: Crop nitrogen status

DM: Dry matter

Nc: Critical nitrogen

NNI: Nitrogen nutrition index

RY: Relative yield

W: Total biomass

1.1. Introduction

Plant-based diagnosis methods can be used to improve the efficiency of nitrogen (N) fertilizers use and reduce the risks of N losses to the environment. The nitrogen nutrition index (NNI) is recognized as a reliable, plant-based method for diagnosing the crop N status (CNS) (Justes et al. 1994; Bélanger et al. 2001; Ziadi et al. 2008; Lemaire and Gastal 2009; Li et al. 2012). The NNI was proposed to quantify the intensity of both N deficiency and luxury consumption of a given crop (Justes et al. 1994; Lemaire and Gastal 1997) and to establish its N requirements (Giletto and Echeverría 2012). The NNI is calculated as the ratio between the plant N concentration and the critical N (Nc) concentration. The Nc concentration is defined as the minimum plant N concentration allowing maximum shoot biomass (Ulrich 1952). The concept of an Nc curve based on the N concentration in whole plants was first developed by Lemaire and Salette (1984) for tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and has been successfully applied to many crops including wheat (*Triticum aestivum* L.) (Justes et al. 1994; Ziadi et al. 2010), corn (*Zea mays* L.) (Plénet and Lemaire 2000; Ziadi et al. 2008), rapeseed (*Brassica napus* L.) (Colnenne et al. 1998), rice (*Oryza sativa* L.) (Sheehy et al. 1998) and potato (*Solanum tuberosum* L.) (Greenwood et al. 1990; Duchenne et al. 1997; Bélanger et al. 2001; Giletto and Echeverría 2012). The Nc is represented by an allometric function:

$$\text{eq. 1} \\ \text{Nc}(\%) = a W^{-b}$$

where W is the total biomass expressed in tons (t) of dry matter (DM) ha^{-1} , Nc is the total N concentration in the plant expressed in grams per 100 g of DM (%), and a and b are parameters to be estimated (Bélanger and Gastal 2000). The parameter a represents the N concentration at a total biomass of 1 t DM ha^{-1} , and b represents the coefficient of dilution which describes the relationship of decreasing N concentration with increasing W . In potato, due to the strong effect of N nutrition on the partitioning of DM between shoots and tubers, the values of a and b are estimated using the combined biomass of shoots and tubers and the corresponding N concentration of this combined biomass (Duchenne et al. 1997; Bélanger et al. 2001; Giletto and Echeverría 2012).

For potato, parameters a and b were reported for different cultivars and under different pedo-climatic conditions. Greenwood et al. (1990) reported values of $a = 5.36$ and $b = 0.46$ for cultivar (cv.) Voran and cv. Eigenheimer (data from Scotland and the Netherlands); Duchenne et al. (1997) reported values of $a = 5.21$ and $b = 0.56$ for cultivars Bintje, Kaptah Vandel, Russet Burbank and Saturna (data from France); Bélanger et al. (2001) reported values of $a = 5.04$ and $b = 0.42$ for cv. Shepody and values of $a = 4.57$ and $b = 0.42$ for cv. Russet Burbank (data from Canada); and Giletto and Echeverría (2012) reported values of $a = 5.30$ and $b = 0.42$ for cv. Innovator (data from Argentina). For biomass less than 1 t ha^{-1} , N_c takes a constant value due to its small decline with increasing W (Justes et al. 1994) and the lack of competition for light of isolated plants (Lemaire and Gastal 1997). For potato, Duchenne et al. (1997) reported a constant value for W less than 1.35 t ha^{-1} which coincides with the beginning of competition between plants for light and also with the time of tuber initiation. Greenwood et al. (1990), Duchenne et al. (1997) and Giletto and Echeverría (2012) based their estimation of the N_c curve on data with a range of W up to $12\text{--}15 \text{ t ha}^{-1}$. Bélanger et al. (2001) selected W ranging from 1 to 6 t DM ha^{-1} to avoid measurements with senescence towards the end of the growth cycle.

To our knowledge, no critical curve was established in Belgium for the potato crop. The objectives of this study were (i) to establish the specific potato N_c dilution curve for cv. Bintje under Belgian growing conditions; (ii) to verify if the established curve for Bintje could be used for cv. Charlotte; (iii) to compare the established curve with the existing N_c curves for potato established in other countries; and (iv) to assess the possibility of using the obtained N_c curve to evaluate the potato CNS and to predict the final yield.

1.2. Material and methods

1.2.1. Field experiments

Experiments in various regions of Belgium were used to estimate the N_c curve. These experiments consisted of several previous trials implemented in the framework of larger studies conducted at the Walloon Agriculture Research Centre (from 1997 to 2000, in 2004 and from 2010 to 2014). Trials included two cultivars: Bintje and Charlotte. Cultivar Bintje was chosen as it is the most important cv. in Belgian agriculture. In order to verify if the established curve could also be used for other cultivars with shorter growing season, cv. Charlotte was also used in this study as it has an early growing cycle compared to mid-early growing cycle for Bintje. Table 1 summarizes the site characteristics of the experiments. The experimental design for the period 1997–2010 was a randomized block scheme with increasing N-fertilizer rates. From 2011 to 2014, the design was a split-plot block scheme with cultivars Bintje and Charlotte as main plots and N rates as sub-plots. Ammonium nitrate fertilizer (solid granules, 27% N + 4% MgO) was broadcasted and incorporated just before planting. Phosphorus (P) and potassium (K) fertilizers were applied before planting at rates around $70\text{--}80 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$ and $250\text{--}300 \text{ kg K}_2\text{O ha}^{-1}$. Trials were rain fed, and no period of significant drought stress was observed for those trials.

1.2.2. Analytical methods

Plant samples were collected for all the sites for different sampling dates (except for the site Roisin 2000 for which there was only one sampling date) (Table 1). Eight plants per plots were collected and taken to the laboratory. The harvested plots were spaced out to avoid the influence of the previous sample collection. The plants were washed, air dried and weighed in order to determine separately the shoots (leaves + stems) and tubers' fresh weights. Sub-samples of each plant part were then dried at 80 °C up to constant dry weight. The DM concentration of each sample was then calculated. W was calculated by adding the shoot biomass and tuber DM. The dried samples of shoots and tubers were finely crushed with a Cyclotec 1093 sample mill (FOSS, Tecator). The N concentration in shoots and tubers was determined with near-infrared (NIR) spectroscopy using a FOSS-NIR Systems 6500 scanning instrument (NIR-Systems, Silver Springs, MD) and calibrated using the Dumas combustion method (LECO, St. Joseph, MI, USA) and the statistical method developed by Shenk and Westerhaus (1993). The N concentration (% N) in W was calculated as:

$$\%N = \frac{(\%N_{shoots} \times W_{shoots}) + (\%N_{tubers} * W_{tubers})}{w} \quad \text{eq. 2}$$

where % N_{shoots} and % N_{tubers} are the N concentrations in shoots and tubers respectively, expressed in grammes per 100 g⁻¹ of DM. W is the total biomass in t DM ha⁻¹, W_{shoots} is the shoot biomass in t DM ha⁻¹ and W_{tubers} is the tuber biomass in t DM ha⁻¹.

1.2.3. Data processing

The collected data set for cv. Bintje was divided in a calibration and a validation data set (Table 1). The calibration of the Nc curve requires the identification of data points for which N does not limit crop growth. Therefore, a procedure was used similar to Greenwood et al. (1990) as Duchenne et al. (1997), Bélanger et al. (2001), Ziadi et al. (2008), Giletto and Echeverría (2012) and Li et al. (2012) did. At each sampling date, for cv. Bintje, W and total biomass N concentration were analysed by analysis of variance (*F* test) and the LSD test (SAS 9.4). Sampling dates were not used for the determination of the Nc curve when the *F* value indicated no significant difference ($p \leq 0.05$) of W among the N application rates. For the remaining sampling dates, the significantly highest W obtained with any level of fertilizer and the corresponding N concentration (%) were identified using the LSD test ($p \leq 0.05$). These data points were used for the establishment of the Nc curve. Where the highest W was obtained with more than one N-fertilizer level, the data obtained with the lower N level was selected for the establishment of Nc curve.

Table 1. Soil and crop characteristics of the experimental sites in Belgium used for the calibration and the validation (*) of the critical N (N_c) curves.

Year	Cultivar	Site	Soil organic matter (%)	Soil mineral N before plantation (kg ha ⁻¹) (0-60 cm)	Soil type	Rainfalls from April to August (mm)	Planting date	Crop emergence date	Applied N (kg ha ⁻¹)	Plant sampling dates
1997	Bintje	Gembloux	2.2	29	Silt loam	339	8/4	23/5	0-75-113-150-188	12/6-24/6-3/7-16/7-30/7-12/8
	Bintje	Masnuy	2.3	72	Sandy loam	344	3/4	20/5	0-58-87-115-144	10/6-1/7-24/7
1998	Bintje	Gembloux	2.1	27	Silt loam	449	4/5	21/5	0-88-132-176-220	22/6-1/7-13/7-20/8
	Bintje	Gouy*	1.9	55	Sandy Loam	429	23/4	25/5	0-88-132-176-220	24/6-7/7-15/7-25/8
1999	Bintje	Franière	2.6	26	Loam	322	4/5	25/5	0-119-170-221	28/6-27/8
	Bintje	Gembloux*	1.6	35	Silty clay loam	381	4/5	25/5	0-119-170-221	14/6-24/6-8/7-19/7-30/8
	Charlotte	Gembloux	1.6	35	Silty clay loam	381	4/5	26/5	0-84-120-156	6/7-22/7-5/8
	Bintje	Incourt	1.8	33	Loam	289	6/5	25/5	0-112-160-208	28/6-23/8
	Bintje	Marcq	1.8	7	Loam	328	4/5	25/5	0-105-150-195	1/7-18/8

Table 1. to be continued.

Year	Cultivar	Site	Soil organic matter (%)	Soil mineral N before plantation (kg ha ⁻¹) (0-60 cm)	Soil type	Rainfalls from April to August (mm)	Planting date	Crop emergence date	Applied N (kg ha ⁻¹)	Plant sampling dates
1999	Bintje	Pontillas	1.5	13	Loam	374	2/5	25/5	0-88-125-163	28/6-16/8
2000	Bintje	Gembloux*	2	33	Silty clay loam	431	11/4	15/5	0-102-145-189	15/6-29/6-13/7-16/8
	Bintje	Longpré	2.2	27	Loam	458	14/4	14/5	0-98-140-182	9/8
	Bintje	Roisin	2.2	27	Loam	445	13/4	6/6	0-102-145-189	19/7
2004	Bintje	Gembloux	2.2	26	Silt loam	332	16/4	21/5	0-100-140-180-240	14/6-21/6-28/6-5/7-12/7-19/7-27/7-9/8
2010	Bintje	Gembloux	1.6	36	Silt loam	375	26/4	26/5	0-115-165-215-248	14/6-28/6-5/7-12/7-26/7
	Charlotte	Gembloux	1.6	36	Silt loam	375	26/4	3/6	0-100-140-180-210	17/6-1/7-8/7-15/7-19/7
2011	Bintje	Gembloux	1.7	39	Silt loam	303	19/4	19/5	0-98-140-180-210	14/6-6/7-20/7-25/7

Table 1. to be continued.

Year	Cultivar	Site	Soil organic matter (%)	Soil mineral N before plantation (kg ha ⁻¹) (0-60 cm)	Soil type	Rainfalls from April to August (mm)	Planting date	Crop emergence date	Applied N (kg ha ⁻¹)	Plant sampling dates
2011	Charlotte	Gembloux	1.7	39	Silt loam	303	19/4	19/5	0-84-120-156-180	20/6-4/7-11/7-18/7
2012	Bintje	Gembloux	2.2	46	Silt loam	342	13/5	2/6	0-50-100-150-200-250	27/6-4/7-11/7-25/7
	Charlotte	Gembloux	2.2	46	Silt loam	342	13/5	1/6	0-50-100-150-200-250	27/6-2/7-9/7-16/7
2013	Bintje	Gembloux*	1.3	36	Silt loam	298	25/4	7/6	0-50-100-150-200-250	19/6-26/6-11/7-23/7
	Charlotte	Gembloux	1.3	36	Silt loam	298	25/4	5/6	0-50-100-150-200-250	17/6-24/6-1/7-15/7
2014	Bintje	Gembloux	2.1	72	Silt loam	428	15/4	21/5	0-100-200-250	18/6-3/7-30/7
	Charlotte	Gembloux1	2.1	72	Silt loam	428	15/4	18/5	0-100-200-250	16/6-26/6-28/7
	Charlotte	Gembloux2*	2.4	39	Silt loam	428	15/4	19/5	0-100-250	24/6-8/7-15/7-23/7

Harvesting dates for Bintje were from the end of August to the beginning of October and for Charlotte from mid of August to the end of September.

Only data with W higher than 1 t DM ha⁻¹ were used for the calibration of Nc curve. The set of data was limited to the period of June and July (period between 20 and 70 days after emergence (DAE)) to avoid including measurements in the senescence period corresponding to the end of the growth cycle. The parameters of Nc curve in Eq. (1) were obtained using the SAS non-linear regression procedure (PROC NLIN). Pseudo-*R*² was used to assess model fit with the SAS non-linear procedure (Brook et al. 2008).

The validation data for cv. Bintje were also classified using the LSD test ($p \leq 0.05$). For each sampling date, a treatment with significantly lower W than the W of the treatment having received higher N rate was considered to be a limiting N condition. A treatment with significantly higher W than the W of the treatment having received lower N rate was considered to be a non-limiting N condition. Treatments were not selected if their W was classified in more than one group.

For cv. Charlotte, due to the limited number of data points meeting the aforementioned criteria (only four points), the Nc curve was not established. This set of data was used to verify if the established curve for cv. Bintje could also be used for cv. Charlotte by identifying the limiting N conditions and the non-limiting N conditions (LSD test at $p \leq 0.05$).

The NNI for Bintje was calculated at each sampling date as the ratio between the measured % N concentration in W (as in Eq. 2) and the predicted % Nc. The relative yield (RY) was calculated as the ratio of the tuber yield obtained for a given N rate with the highest tuber yield obtained among all N application rates.

The relationship between NNI and RY was defined for three periods of the crop growth season. The three functions were estimated using the SAS quadratic plateau procedure (PROC NLIN). The first quadratic function took into account the average of the NNI values across all sampling dates (Ziadi et al. 2010; Li et al. 2012). The second function took into account the average of the NNI values across the period between 20 and 55 days after emergence (DAE). This period corresponds to the optimal period for assessment of CNS as previously stated by Olivier et al. (2006). The third function took into account the NNI calculated for the last sampling dates for each site (dates between 44 and 94 DAE). The last sampling date corresponded to the available one closest to the harvesting date. This third period is similar to that used by Chambenoit et al. (2004) (NNI measured just before haulm destruction) and Giletto and Echeverría (2012) (NNI measured at tuber bulking) for establishing the relationship between RY and NNI.

1.3. Results and discussion

1.3.1. Total crop biomass production and nitrogen concentration

The W production during the growing season ranged from 0.33 to 12.71 t DM ha⁻¹ for Bintje and from 0.46 to 12.83 t DM ha⁻¹ for Charlotte depending on N applications rates, sampling dates, site and year (Table 2).

Table 2. Total biomass production for different potato trials conducted in Belgium with increasing N-fertilizer rates from 1997 to 2014 of cultivar Bintje or Charlotte.

Cultivar	Sites	Year	Date	DAE ^a	Total Biomass (t DM ha ⁻¹)					F test ^b	LSD ^c
Bintje	<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	75	113	150	188		
	Gembloux	1997	12/06	21	0.79	1.15	1.14	1.2	1.25	*	0.27
			24/06	33	2.17	3.08	3.38	3.33	3.31	**	0.68
			3/07	42	3.42	5.32	4.87	5.19	5.03	*	1.09
			16/07	55	6.44	8.82	8.17	8.25	8.84	**	1.08
			30/07	69	9.37	12.36	10.85	12.34	12.71	*	2.03
	<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	58	87	115	144		
	Masnuy	1997	10/06	22	1.08	0.89	1.06	1.08	0.84	ns	
			1/07	43	4.05	5.63	4.51	4.67	4.95	ns	
			24/07	66	10.42	11.76	11.24	9.43	10.58	ns	
	<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	88	132	176	220		
	Gembloux	1998	22/06	33	0.93	1.78	1.66	1.82	1.66	**	0.46
			1/07	42	2.44	3.59	3.41	3.66	3.66	**	0.6
			13/07	54	5.16	8.23	6.48	6.58	7.08	**	1.31
			24/06	31	1.07	1.73	1.89	1.9	1.51	ns	
Gouy			1998	7/07	44	3.47	4.62	4.33	5.5	4.06	*
	15/07	52		4.4	6.75	6.61	7.97	5.59	*	1.97	
<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	119	170	221				
Franière	1999	28/07	35	1.87	2	1.75	1.97		ns		
Gembloux	1999	14/07	21	0.53	0.5	0.4	0.44		ns		

Table 2. To be continued

Cultivar	Sites	Year	Date	DAE ^a	Total Biomass (t DM ha ⁻¹)				F test ^b	LSD ^c
Bintje	<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	119	170	221		
	Gembloux	1999	24/07	31	1.66	2.12	1.72	2	ns	0.73
			8/07	45	4.44	5.39	5.5	5.38	*	
			19/07	56	7.82	8.96	7.29	8.24	ns	
	<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	112	160	208		
	Incourt	1999	28/06	35	2.64	2.53	2.48	2.34	ns	
	<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	105	150	195		
	Marcq	1999	1/07	38	1.96	2.06	2.24	2.27	ns	
	<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	88	125	163		
	Pontillas	1999	28/06	35	2.64	3.31	3.31	3.36	*	0.55
	<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	102	145	189		
	Gembloux	2000	15/06	32	1.75	2.78	2.38	2.71	*	0.68
			29/06	46	4.69	5.83	5.15	5.62	ns	
			13/07	66	8.06	8.92	8.32	8.49	ns	
	<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	102	145	189		
Roisin	2000	19/06	44	2.43	2.88	2.68	2.6	ns		
<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	100	140	180	240		
Gembloux	2004	14/06	25	0.62	0.94	1.01	0.96	0.92	ns	
		21/06	32	1.88	2.49	2.52	2.45	2.37	ns	
		28/06	39	2.94	4.1	3.73	3.85	3.99	*	0.6

Table 2. To be continued

Cultivar	Sites	Year	Date	DAE ^a	Total Biomass (t DM ha ⁻¹)					F test ^b	LSD ^c
Bintje	<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	100	140	180	240		
	Gembloux	2004	5/07	46	4.19	5.53	5.78	5.46	6.08	**	0.71
			12/07	53	5.67	7.29	6.82	6.98	7.47	***	0.48
			19/07	60	6.7	9.01	8.73	8.39	9.35	**	1.32
			27/07	68	8.16	10.81	10.24	11.06	10.98	*	2.04
	<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	115	165	215	248		
	Gembloux	2010	14/06	25	0.65	0.83	0.71	0.77	0.68	ns	
			28/06	34	3.1	3.19	3.42	3.22	3.42	ns	
			5/07	41	4.2	4.33	4.34	4.06	4.41	ns	
			12/07	48	5.12	5.5	5.24	5.43	5.27	ns	
			26/07	62	7.19	7.72	8.15	7.07	7.8	ns	
	<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	98	140	182	210		
	Gembloux	2011	14/06	27	1.44	1.46	1.27	1.55	1.36	ns	
			6/07	49	5.55	5.15	5.41	5.37	5.53	ns	
			20/07	63	8.26	8.25	8.04	8.88	8.53	ns	
			25/07	68	8.77	10.22	8.86	9.42	9.3	ns	
<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				0	50	100	150	200	250		
Gembloux	2012	27/06	26	1.02	1.1	1.21	1.37	1.28	1.32	ns	
		4/07	33	1.91	2.83	2.83	2.75	3.25	2.97	**	0.55

Table 2. To be continued

Cultivar	Sites	Year	Date	DAE ^a	Total Biomass (t DM ha ⁻¹)					F test ^b	LSD ^c	
			<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>		<i>0</i>	<i>50</i>	<i>100</i>	<i>150</i>	<i>200</i>	<i>250</i>		
Bintje	Gembloux	2012	11/07	40	3.25	3.41	4	4.28	4.29	4.66	***	0.41
			25/07	54	5.82	7.31	6.06	7.54	5.4	6.21	ns	
			19/06	13	0.33	0.44	0.41	0.44	0.52	0.43	ns	
	Gembloux	2013	26/06	20	1	1.41	1.16	1.45	1.23	1.29	ns	
			11/07	35	3.79	4.33	4.35	4.64	5.04	4.5	ns	
			23/07	47	5.19	6.67	7.14	7.21	7.13	6.76	*	1.36
	Gembloux	2014	18/06	29	2.51		2.91		2.85	2.67	ns	
			3/07	44	5.99		5.99		6.75	6.76	ns	
			30/07	71	10.23		11.7		11.1	11.77	ns	
			<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>		<i>0</i>	<i>84</i>	<i>120</i>	<i>156</i>				
	Gembloux	1999	6/07	42	3.07	3.43	4.22	4.32			ns	
			22/07	58	5.79	8.47	7.7	8.29			ns	
			<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>		<i>0</i>	<i>100</i>	<i>140</i>	<i>180</i>	<i>210</i>			
Charlotte			17/06	15	0.88	1.04	1.03	0.83	0.96		ns	
			1/07	29	3.34	4.01	3.71	3.3	3.35		ns	
	Gembloux	2010	8/07	36	4.72	5.13	4.38	5.07	5.22		ns	
			15/07	43	5.83	5.91	6.11	5.19	5.93		ns	
			19/07	47	5.36	6.08	6.05	5.95	6.16		ns	

Table 2. To be continued

Cultivar	Sites	Year	Date	DAE ^a	Total Biomass (t DM ha ⁻¹)					F test ^b	LSD ^c	
Charlotte			<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>		0	84	120	156	180			
	Gembloux	2011	20/06	33	2.36	2.64	2.32	2.77	2.95	ns		
			4/07	47	5.17	5.59	5.32	6.03	5.19	ns		
			11/07	54	6.45	7.6	6.37	7.57	6.47	ns		
			18/07	61	8.51	9.64	9.4	9.68	10.13	ns		
			<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>		0	50	100	150	200	250		
	Gembloux	2012	27/06	27	1.27	1.35	1.46	1.49	1.5	1.46	ns	
			2/07	32	2.09	2.38	2.74	2.64	2.69	2.63	ns	
			9/07	39	4.09	4.54	4.1	4.54	4.57	4.3	ns	
			16/07	48	5.01	4.8	5.5	5.47	5.96	5.49	ns	
			17/06	13	0.46	0.58	0.63	0.53	0.61	0.54	**	0.09
	Gembloux	2013	24/06	20	1.03	1.37	1.51	1.43	1.7	1.36	**	0.31
			1/07	27	2.19	2.53	2.91	2.94	3.27	2.98	**	0.51
			15/07	41	5.34	6.7	6.91	7.41	6.96	6.94	***	0.68
			<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>		0	100	200	250				
	Gembloux1	2014	16/06	30	2.42	2.41	2.69	2.53			ns	
26/06			44	5.43	5.73	5.74	5.87			ns		
28/07			72	9.45	11.16	11.67	12.83			ns		

Table 2. To be continued

Cultivar	Sites	Year	Date	DAE ^a	Total Biomass (t DM ha ⁻¹)			F test ^b	LSD ^c
	<i>Applied N (kg N ha⁻¹)</i>				<i>0</i>	<i>100</i>	<i>250</i>		
			24/06	36	3.31	3.87	3.53	ns	
Charlotte	Gembloux2	2014	8/07	51	6.02	7.22	7.24	*	0.89
			15/07	58	7.22	7.88	8.91	ns	
			23/07	66	8.92	10.89	10.03	ns	

Bold numbers represents total biomass used for the validation

^a days after emergence

^b *F test indicating statistical significance at $p \leq 0.05$; **F test indicating statistical significance at $p \leq 0.01$;

***F test indicating statistical significance at $p \leq 0.001$; ns indicates no significance ($p > 0.05$);

^c Least significant difference calculated if the F test indicated significant difference among total biomass (t of dry matter ha⁻¹)

Except for some situations (particularly at the beginning of the growing cycle), W generally increased with increasing N rates. This effect, not always statistically significant, was observed especially by comparing the non-fertilized treatments to N fertilized treatments.

The change of crop N concentration with time for Bintje in 1998 at Gembloux is shown as an example (Figure 9). Crop N concentrations varied from a maximum of 5.23% of DM (observed for the 176 N rate at 22/6) to a minimum of 0.88% of DM (observed for the 0 N rate at 20/8). The N concentration decreased as W increased during the growing season. This decline of N concentration with time reported by many studies (Justes et al. 1994; Duchenne et al. 1997; Bélanger et al. 2001; Li et al. 2012; Giletto and Echeverría 2012) corresponds to the dilution phenomenon which is mainly attributed to two processes. The first process corresponds to self-shading of leaves that induces a non-uniform leaf N concentration from the top of the canopy layers with high N concentration to the shaded layers with low N concentration (Lemaire et al. 1991; Pons and Percy 1994). The second process is the increase in the proportion of plant structural and storage tissues with a lower nitrogen concentration (Caloin and Yu 1984). Crop N concentration varied significantly with N rates; higher N rates mostly resulted in higher N concentrations (Figure 9).

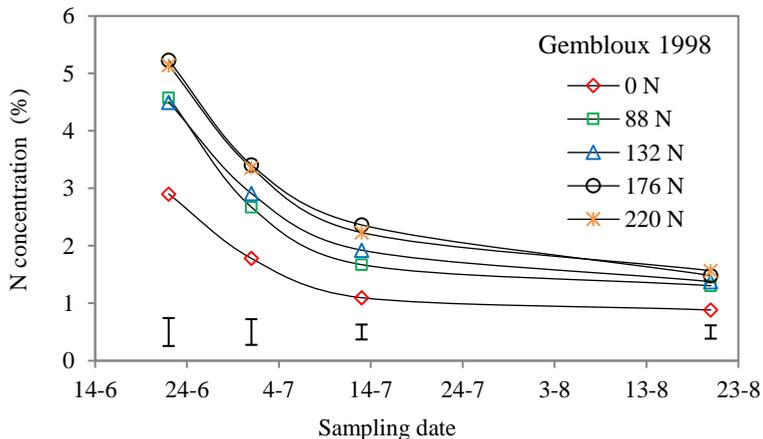


Figure 9. Changes of nitrogen concentration in total biomass (W, expressed in % of dry matter) with time for potato cultivar Bintje under different N rates (kg N ha⁻¹) at the site Gembloux in 1998. The vertical bars represent LSD values ($p \leq 0.05$) at each plant sampling date.

1.3.2. Determination of the critical nitrogen dilution curve for cultivar Bintje

Among the sites and years used to establish the critical dilution curve, 16 sampling dates (between 21 and 69 DAE) for Bintje met the previously defined statistical criteria. Each of these sampling dates provided a point of Nc concentration for a given W (Table 3).

Table 3. Critical nitrogen concentration data points selected for the calibration of the Belgian critical nitrogen dilution curve for cultivar Bintje.

Sites	Sampling dates	DAE	Applied N	Total biomass	Nc concentration
Gembloux	12 June 1997	21	75	1.15	4.45
Gembloux	24 June 1997	33	75	3.08	3.53
Gembloux	3 July 1997	42	75	5.32	2.79
Gembloux	16 July 1997	55	75	8.82	1.86
Gembloux	30 July 1997	69	113	10.85	1.55
Gembloux	22 June 1998	33	88	1.78	4.58
Gembloux	1 July 1998	42	88	3.59	2.67
Gembloux	13 July 1998	54	88	8.23	1.67
Pontillas	28 June 1999	35	88	3.31	3.29
Gembloux	28 June 2004	39	100	4.10	2.96
Gembloux	5 July 2004	46	100	5.53	2.22
Gembloux	12 July 2004	53	240	7.47	2.48
Gembloux	19 July 2004	60	100	9.01	1.57
Gembloux	27 July 2004	68	100	10.81	1.47
Gembloux	4 July 2012	33	50	2.83	3.47
Gembloux	11 July 2012	40	250	4.66	3.40

Applied nitrogen (N) in kg ha⁻¹, total biomass expressed in t of dry matter ha⁻¹, critical nitrogen (Nc) concentration expressed in percentage of dry matter and DAE day after emergence of the crop.

As illustrated in Figure 10, the allometric equation obtained for cv. Bintje was

$$\text{eq. 3} \\ \text{Nc(\%)} = 5.37 \text{ W}^{-0.45}$$

The model accounted for 86% of the total variance. The 95% confidence interval of the mean was 1.30 N (in % of DM) for a W of 1.15 t DM ha⁻¹ and 0.54 N (in % of DM) for a total biomass of 10.85 t DM ha⁻¹.

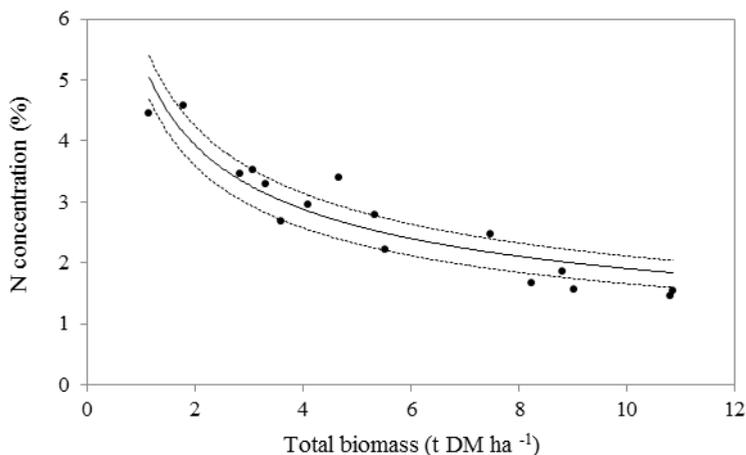


Figure 10. Critical nitrogen (N_c) concentration data points used to define the critical N dilution curve of potato for cultivar Bintje in Belgium. The solid line represents the critical N dilution curve with the relation $N_c (\%) = 5.37 W^{-0.45}$ ($R^2 = 0.86$). The dotted lines represent the confidence band ($p = 0.95$) for mean prediction.

1.3.3. Comparison with available critical nitrogen dilution curves for potato crop

Figure 11 shows that the N_c curve defined in this study was very similar to the reference curve of Greenwood et al. (1990) and clearly above the reference curve established by Duchenne et al. (1997). Taking into account the curves of Bélanger et al. (2001), the Belgian curve is relatively similar to the one established for cv. Shepody (particularly from medium W productions) and above the one established for cv. Russet Burbank. Comparing the curve obtained by Giletto and Echeverría (2012), the Belgian curve is slightly lower, particularly for the medium and the higher W productions.

In this study, the coefficient a (5.37) for the dilution curve equation was very similar to the ones of Greenwood et al. (1990) (5.36) and Giletto and Echeverría (2012) (5.30). Similarly, the coefficient of dilution b (0.45) was close to the coefficient obtained by Greenwood et al. (1990) (0.46) and Giletto and Echeverría (2012) and Bélanger et al. (2001) (0.42).

The reasons for the difference observed between the coefficients of the Belgian curve and the reference curves of Duchenne et al. (1997) and Bélanger et al. (2001) for cv. Russet Burbank could be related to various factors including differences in cultivars, climatic conditions and field management.

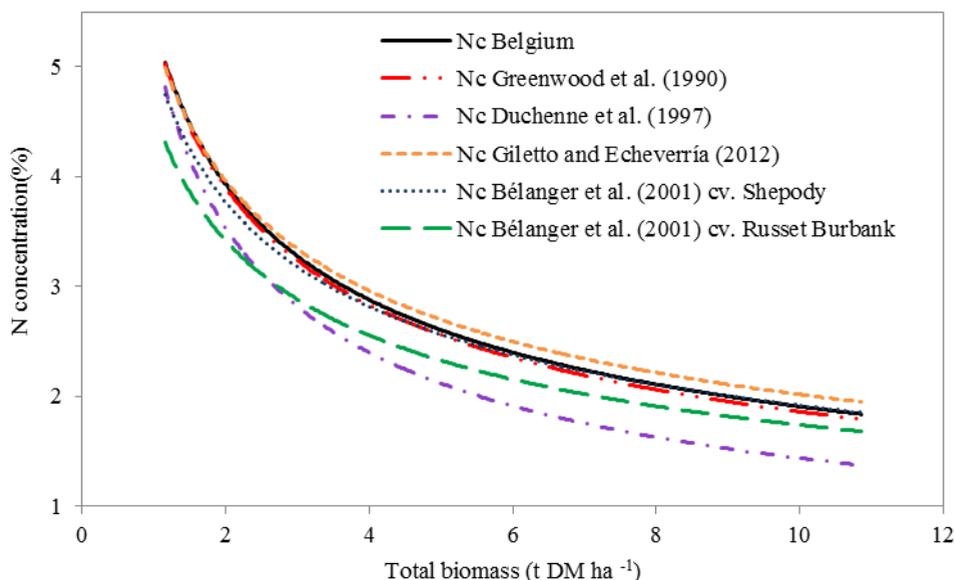


Figure 11. Comparison of different critical nitrogen curves for potato. The *full black line* represents the Belgian critical N curve (this study) ($N_c (\%) = 5.37 W^{-0.45}$ for cv. Bintje). The other curves represent the proposed reference by Duchenne et al. (1997) ($N_c (\%) = 5.21 W^{-0.56}$), by Greenwood et al. (1990) ($N_c (\%) = 5.36 W^{-0.46}$), by Giletto and Echeverría (2012) ($N_c (\%) = 5.30 W^{-0.42}$) and by Bélanger et al. (2001) (for cv. Shepody $N_c (\%) = 5.04 W^{-0.42}$ and for cv. Russet Burbank $N_c (\%) = 4.57 W^{-0.42}$).

Duchenne et al. (1997) established the N_c curve on the basis of three experimental years on two cultivars Bintje and Kaptah Vandel. The curve was then validated for Saturna, El Kana and Russet Burbank in loamy soils and for Bintje in calcareous clay and calcareous soils (Chambenoit et al. 2004). The critical points obtained for each cultivar were close to the established N_c curve for Bintje and Kaptah Vandel. Chambenoit et al. (2004) stated that varietal differences may exist but were not detectable given the precision level of the used experimental design. The cultivar differences seem mainly related to the earliness of each cultivar that determines the maximum production of dry matter and therefore the dilution of the nitrogen in the plant biomass (Chambenoit et al. 2004). Vos (1997) reported that the relationship between N uptake and biomass accumulation should be different for genotypes of different earliness. Giletto and Echeverría (2015) found that cultivars with shorter growing season (cultivars Innovator and Gem Russet) had lower plant N concentration for a same level of total biomass than cultivars with longer growing seasons (cultivars Umatilla Russet, Bannock Russet and Markies Russet). Contrary to Giletto and Echeverría (2015), Bélanger et al. (2001) found greater N concentration for the cultivar Shepody with shorter season than for Russet Burbank. Giletto and Echeverría (2015) reported different statistical value in the coefficient b between the tested cultivars but showed no statistical differences in coefficient a .

However, Bélanger et al. (2001), reported different values of coefficients a and similar values of coefficient b for Shepody and Russet Burbank. According to Bélanger et al. (2001), the observed difference in the coefficient a was caused by differences in plant density. The cultivar with greater plant density had smaller plants with greater N concentration than the cultivars with low plant density. Similar b coefficients indicated that both cultivars had similar N dilution (Bélanger et al. 2001). In our study, the plant density was different according to the seed size used.

Bélanger et al. (2001) reported also different parameters a and b of the Nc curve for both studied cultivars according to the water regime. The N concentration at a given level of total biomass, primarily for Russet Burbank, was lower without than with irrigation. The water deficiency decreased N uptake and therefore indirectly created conditions of N deficiency (Bélanger et al. 2001). The curve of Duchenne et al. (1997) was established under growing conditions for which water was not limiting growth. In this study, the Nc curve for Bintje was established for Belgian climate and soil conditions for which temporary water deprivation may occur. The climate in Belgium is a temperate maritime climate with cool summers and moderate winters which is similar to the climate of the north of France, Scotland and the Netherlands. According to Lemaire and Gastal (1997), the relationship between Nc concentration and crop mass does not vary considerably with major environmental factors others than those affecting soil N supply. Ziadi et al. (2010) stated that climatic conditions could explain part of the difference observed between the Canadian Nc curve of spring wheat and the French curve of winter wheat developed by Justes et al. (1994).

The observed difference with the Nc curve of Duchenne et al. (1997) could also be due to their applied statistical method which corresponds to the classification of the W values using the Newman and Keuls test for $p = 0.10$. The range of plant weights used for the calibration of the Nc curves could also have influenced the relationship between Nc and W. Contrary to Bélanger et al. (2001), who limited the data set to W less than 6 t DM ha⁻¹, the W used in this study for the establishment of the curve ranged from 1.15 to 10.85 t DM ha⁻¹ corresponding to the period from June to July. Greenwood et al. (1990), Duchenne et al. (1997) and Giletto and Echeverría (2012) based their estimation on data with a range of W up to 12–15 t DM ha⁻¹.

1.3.4. Validation of the critical nitrogen dilution curve for cultivars Bintje and Charlotte

The crop is considered in non-limiting N conditions if the actual N concentration is higher than the Nc concentration required for maximum growth rate. The crop is in limiting growth condition if the actual N concentration is below the Nc curve. In the validation data set for cv. Bintje (see Table 1), 5 points were in limiting N conditions and 12 points in non-limiting N conditions (Figure 12). All data points identified as limiting N conditions were under the Nc curve and all the data points identified as non-limiting N conditions (except 1) were above the curve (Figure 12). These observations tend to confirm that the Nc curve can be used for the discrimination between the limiting and non-limiting N conditions and the determination of CNS for the cv. Bintje in Belgian conditions.

Following the same approach, 4 limiting N conditions and 5 non-limiting N conditions were identified for cv. Charlotte. As for cv. Bintje, all the limiting N conditions were under the Nc curve and all the non-limiting N conditions (except 1) were above the curve. According to the limited number of points for validation, the Nc curve could also be used for the discrimination between limiting and non-limiting N conditions for cv. Charlotte. But since Charlotte is an earlier cultivar than Bintje and, as mentioned before, the earliness of the genotype is a factor of intra-specific variability in potato for the relationship between N concentration and biomass, thus when establishing the Nc curve, the cultivar factor should be taken into account. In this study, due to the limited number of data points, a cultivar difference was not detectable. A study based on a larger data set for cv. Charlotte is therefore needed in order to be able to draw more definitive conclusions.

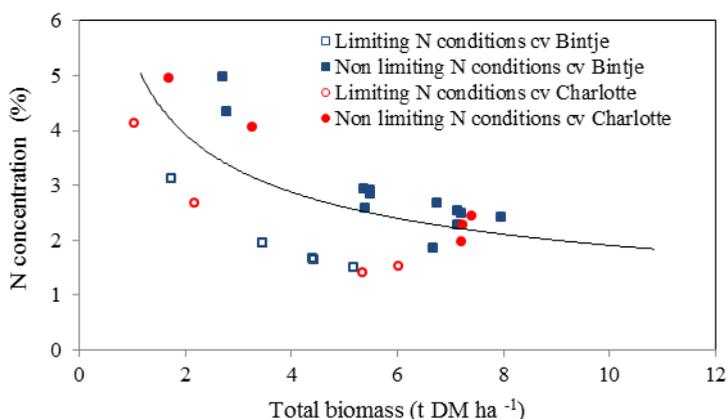


Figure 12. Validation of the Belgian critical N curve using data from potato cultivars Bintje and Charlotte under limiting and non limiting N growth conditions. The *solid line* represents the predicted critical N dilution curve with the relation $N_c (\%) = 5.37 W^{-0.45}$.

1.3.5. Nitrogen nutrition index and its relation to relative yield

The NNI was calculated for each plant sampling date. The NNI in this study ranged from 0.39 to 1.53 (data not shown). As an example, the NNI values over three plant sampling dates at Gembloux in 2014 are given in Figure 13. Values of $NNI \geq 1$ indicate that the crop is non-limiting for N, whereas values of $NNI < 1$ indicate N deficiency (Duchenne et al. 1997). Contrary to the maximum N treatment (250 N), the data points for the non-fertilized treatment were clearly under the reference of 1 indicating N deficiency, whatever the sampling date. The NNI values for the 100 and 200 N treatments were over this reference at the first sampling date but dropped below this threshold at the second sampling date for the 100 N treatment and at the last sampling date for the 200 N treatment.

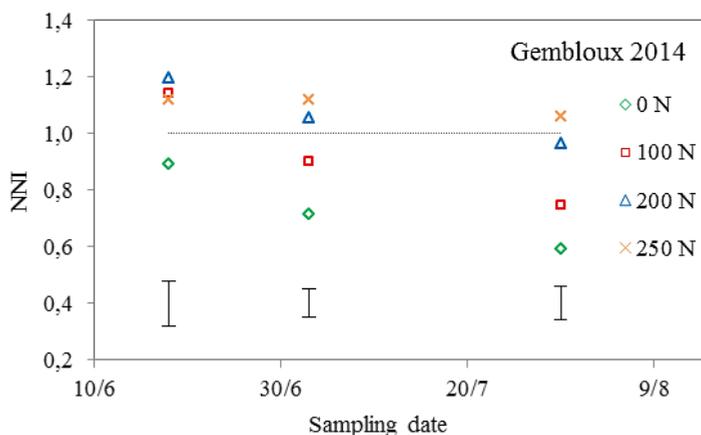


Figure 13. Nitrogen Nutrition Index (NNI) of three sampling dates for increasing N rates (kg N ha⁻¹) at the site of Gembloux in 2014 for cultivar Bintje. The dotted horizontal line represents an NNI of 1.0. The vertical bars represent LSD values ($p \leq 0.05$) at each plant sampling date.

The relationship between NNI and RY expressed by a quadratic plateau function accounted for 79, 75 and 70% of the variation considering the three different periods of plant sampling for the calculation of NNI, i.e. respectively, the mean of all the sampling dates, the mean of sampling between 20 and 55 DAE and the last sampling date closest to harvest (Figure 14). Based on this relationship, the potato RY reached a plateau for a determined NNI value. This value corresponds to the joint point of the quadratic phase and the plateau phase for each of the three curves and was equal to 1.1 (Figure 14a), 1.16 (Figure 14b) and 0.97 (Figure 14c) depending on the considered plant-sampling period. With decreasing NNI value below this joint point, the RY decreased (Figure 14). This confirms the link between N uptake and yield of potato and thus the relevancy of the Nc model and the resulting NNI for forecasting actual yield with respect to potential yield (Chambenoit et al. 2004).

The relationship between NNI and RY, however, varied with the periods of plant sampling for NNI determination (Figure 14). The maximum RY obtained was the same for the three functions (0.97), but the equation of RY corresponding to NNI below the joint point was different. This joint point is important for determining the threshold value under which the crop nitrogen status is considered as deficient with respect to maximum potential yield. The NNI reference value of 1 given by Duchenne et al. (1997) corresponds to the optimum CNS required to achieve the maximum growth rate. Chambenoit et al. (2004) reported values of NNI between 1.1 and 1.2 to maximize the tuber yield. In this study, the reference value of NNI was slightly higher, as in Chambenoit et al. (2004), for Figures 14 a, b with values of 1.1 and 1.16 (when considering all the plant sampling dates or the period between 20 and 55 DAE) and similar for Figure 14c with value of 0.97 (when considering the latest sampling date) compared to the reference value of 1. The period between 20 and 55 DAE has been demonstrated as the optimal period for the assessment of the CNS, according to a previous study by Olivier et al. (2006). Consequently, in this

study, we consider the reference NNI value of 1.16 (Figure 14b), under which the CNS is considered as deficient during the optimal period for CNS assessment.

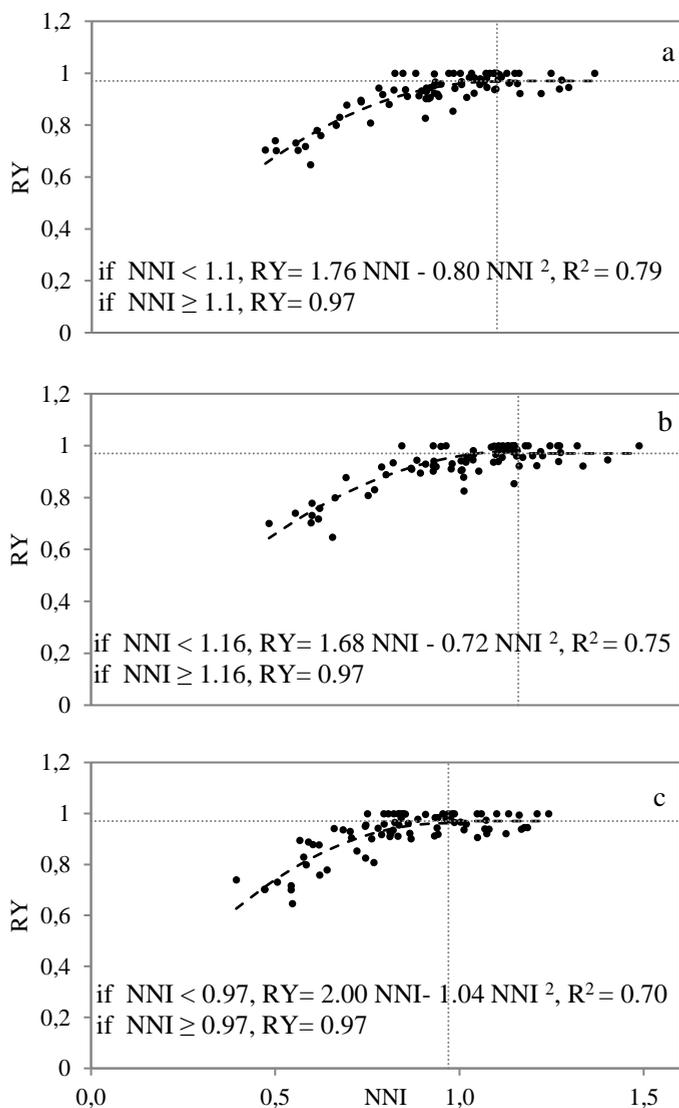


Figure 14. Relationship between relative yield (RY) measured at harvest and nitrogen nutrition index (NNI) for cultivar Bintje measured across all the sampling dates (a), across the period of 20 and 55 DAE (b) and for the last sampling date (c). The *vertical bars* indicate the joint point for each curve, and the *horizontal bars* indicate the plateau of the curve.

1.4. Conclusion

A Nc dilution curve ($Nc (\%) = 5.37 W^{-0.45}$) was developed for potato for cv. Bintje under the Belgian conditions. The Belgian Nc dilution curve was different from the one developed for potato in France but similar to the one developed in Scotland and the Netherlands. The usefulness of the Belgian Nc dilution curve for cv. Charlotte was not fully verified since the validation considered only a limited data set and cultivar difference is reported as a factor of variability of the Nc curve. The Belgian Nc curve and the resulting NNI adequately identified situations of limiting and non-limiting N nutrition and could be used to establish the potato CNS and to predict the final yield. A reference NNI value of 1.16 was established as the threshold value to be achieved during the optimal period for CNS assessment, under which threshold the CNS is considered as deficient.

However, establishing the NNI at field level requires destructive and chemical analysis and is not appropriate for a quick assessment of CNS. The NNI can be used as a reference for calibrating other non-invasive methods for a quick and easy in-season monitoring of CNS (Goffart et al. 2008).

Acknowledgments This study was funded by the federal Ministry of Agriculture (DGA, Brussels) and the regional Walloon (SPW, DGO3, Namur) Public Service in Belgium. Special thanks are addressed to the different technicians, workers and students of the potato service at the Walloon Agriculture Research Centre (Crops Production Systems Unit) for their valuable contribution to the trials.

The statistical assistance of Elena Pitchugina, Viviane Planchon and Yves Brostaux was gratefully acknowledged.

References

- Bélangier G, Gastal F (2000) Nitrogen utilization by forage grasses. *Can J Plant Sci* 80:11–20
- Bélangier G, Walsh JR, Richards JE, Milburn PH, Ziadi N (2001) Critical nitrogen curve and nitrogen nutrition index for potato in eastern Canada. *Am J Potato Res* 78(5):355–364
- Brook AJ, Woodcock BA, Sinka M, Vanbergen AJ (2008) Experimental verification of suction sampler capture efficiency in grasslands of differing vegetation height and structure. *J App Ecol* 45(5):1357–1363

- Caloin M, Yu O (1984) Analysis of the time course of change in nitrogen content in *Dactylis glomerata* L. using a model of plant growth. *Annals Bot* 54:69–76
- Chambenoit C, Laurent F, Machet JM, Boizard H (2004) In : MacKerron DKL, Haverkort AJ (Eds) Decision support systems in potato production, Wageningen, pp 55–67.
- Colnenne C, Meynard JM, Reau R, Justes E, Merrien A (1998) Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter oilseed rape. *Annals Bot* 81:311–317
- Duchenne T, Machet JM, Martin M (1997) In: Lemaire G (ed) Diagnosis of the nitrogen status in crops. Springer, Berlin, pp 119–130
- Giletto CM, Echeverría HE D2012] Critical nitrogen dilution curve for processing potato in Argentinean humid pampas. *Am J Potato Res* 89:102–110. doi:10.1007/s12230-011-9226-z, Accessed 02 January 2015
- Giletto CM, Echeverría HE D2015] Critical nitrogen dilution curve in processing potato cultivars. *Am J Potato Res* 6:3144–3156, http://file.scirp.org/pdf/AJPS_2015121114375992.pdf. Accessed 04 July 2016
- Goffart JP, Olivier M, Frankinet M (2008) Potato crop nitrogen status assessment to improve N fertilization management and efficiency: past–present–future. *Potato Res* 51(3–4):355–383
- Greenwood DJ, Lemaire G, Gosse G, Cruz P, Draycott A, Neeteson JJ (1990) Decline in percentage N of C3 and C4 crops with increasing plant mass. *Ann Bot* 66:425–436
- Justes E, Mary B, Meynard JM, Machet JM, Thelier-Huché L (1994) Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Annals Bot* 74(4):397–407
- Lemaire G, Gastal F (1997) N uptake and distribution in plant canopies. In: Lemaire G (ed) Diagnosis of the nitrogen status in crops. Springer, Heidelberg, pp 3–43
- Lemaire G, Gastal F (2009) Quantifying crop responses to nitrogen deficiency and avenues to improve nitrogen use efficiency. In: Sadras VO, Calderini DF (eds)

- Crop physiology: applications for genetic improvement and agronomy. Elsevier, Burlington, pp 171–211
- Lemaire G, Salette J (1984) Relation entre dynamique de croissance et dynamique de prélèvement d'azote pour un peuplement de graminées fourragères. I.— Etude de l'effet du milieu. *Agron* 4(5):423–430
- Lemaire G, Onillon B, Gosse G, Chartier M, Allirand JM (1991) Nitrogen distribution within a lucerne canopy during regrowth: relation with light distribution. *Annals Bot* 68:483–488
- Li W, He P, Jin J (2012) Critical nitrogen curve and nitrogen nutrition index for spring maize in north east China. *J Plant Nutri* 35(11):1747–176
- Olivier M, Goffart JP, Ledent JF (2006) Threshold value for chlorophyll meter as decision tool for nitrogen management of potato. *Agronomy Journal* 98(3):496–506
- Plénet D, Lemaire G (2000) Relationships between dynamics of nitrogen uptake and dry matter accumulation in maize crops. Determination of critical N concentration. *Plant Soil* 216:65–82
- Pons TL, Percy RW (1994) Nitrogen reallocation and photosynthetic acclimation in response to partial shading in soybean plants. *Physiol Plantarum* 92:636–644
- Sheehy JE, Dionora MJA, Mitchell PL, Peng S, Cassman KG, Lemaire G, Williams RL (1998) Critical nitrogen concentrations: implications for high-yielding rice (*Oryza sativa* L.) cultivars in the tropics. *Field Crop Res* 59:31–41
- Shenk J, Westerhaus M D1993] Monograph: Analysis of agriculture and food products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Infrasoftware International, Port Matilda, 103p
- Ulrich A (1952) Physiological bases for assessing the nutritional requirements of plants. *Annu Rev of Plant Physiol* 3:207–228
- Vos J (1997) The nitrogen response of potato (*Solanum tuberosum* L.) in the field: nitrogen uptake and yield, harvest index and nitrogen concentration. *Potato Res* 40:237–248

Ziadi N, Brassard M, Bélanger G, Cambouris AN, Tremblay N, Nolin MC, Claessens A, Parent LE (2008) Critical nitrogen curve and nitrogen nutrition index for corn in eastern Canada. *Agron J* 100(2):271–276

Ziadi N, Bélanger G, Claessens A, Lefebvre L, Cambouris AN, Tremblay N, Nolin MC, Parent LE (2010) Determination of a critical nitrogen dilution curve for spring wheat. *Agron J* 102:241–250

2. Lien avec le chapitre suivant

Le chapitre 3 présente l'établissement et la validation de l'équation de la courbe critique de dilution de l'azote dans les conditions belges réalisés sur base des résultats spécifiques de la thèse et des essais agronomiques antérieurs du CRA-W sur la période 1997 à 2014 pour deux variétés en pomme de terre (Bintje et Charlotte) recevant des doses croissantes de fumure azotée. Il en ressort que la courbe critique de dilution de l'azote établie pour la variété Bintje en Belgique (N_c (%) = $5,37 W^{-0,45}$, W : matière sèche totale produite en t.ha⁻¹) diffère de celles établies en France ou au Canada. De même, dans les conditions belges, la courbe établie pour Bintje diffère de celle obtenue pour la variété Charlotte. En l'absence de données suffisantes pour la variété Charlotte, seule la courbe de dilution de l'azote pour la variété Bintje est considérée comme une référence en Belgique. Des données supplémentaires sont nécessaires pour augmenter la robustesse et vérifier la validation de la courbe critique de dilution de l'azote pour la variété Charlotte.

L'INN dérivant de la courbe N_c a permis d'identifier de manière adéquate les situations limitantes et non limitantes en azote et peut être utilisé pour évaluer le statut azoté de la culture de pomme de terre.

La modélisation entre INN (mesuré entre 20 et 55 JAE) et rendement relatif par une relation de type quadratique plateau confirme la pertinence de l'INN pour prédire le rendement atteignable en valeur relative par rapport au rendement maximum observé dans plusieurs situations. Il est donc permis d'affirmer que l'estimation du statut azoté de la biomasse entre 20 et 55 JAE permet d'ajuster la fertilisation azotée de la culture en cours de saison pour rencontrer l'objectif final à la récolte qui est d'atteindre un rendement maximum espéré.

Cette relation entre INN et rendement relatif permet également de fixer l'optimum de nutrition azotée pour la culture de pomme de terre, pour la période considérée, nécessaire pour maximiser le rendement en tubercules. Cet optimum est caractérisé par un INN autour de 1.16 sur base du type de la relation choisie (approche linéaire-plateau).

Malgré sa robustesse, l'INN constitue une approche de recherche plutôt qu'un outil de gestion de l'azote. La procédure destructive, des échantillons végétaux prélevés, et également chronophage limite l'application de cette méthode dans le cadre pratique d'une mise en œuvre rapide à l'échelle de la parcelle.

Des mesures indirectes pour la prédiction de l'INN peuvent contourner les limitations pratiques de cette méthode de référence pour l'évaluation du statut azoté de la culture. Ces mesures indirectes reposent sur l'estimation du LAI ou encore sur l'estimation de la matière sèche foliaire. Selon Ata-UI-Karim et al. (2017), l'approche basée sur la matière sèche des feuilles, plutôt que l'approche basée la matière sèche totale, est la méthode la plus appropriée pour développer la courbe N_c permettant de donner une meilleure compréhension du statut azoté de la culture. Une telle approche possède un sens physiologique, car une grande partie de la demande en azote d'une plante est déterminée par la fonction photosynthétique des feuilles (Lemaire et al., 1997). À l'échelle foliaire, d'autres indicateurs peuvent également

être utilisés en vue de l'estimation du statut azoté de la culture et de l'INN. Ces indicateurs fournis par des mesures optiques rapides et non destructives évaluent généralement la teneur en azote à l'échelle foliaire (sur base d'une feuille unique ou encore sur base de la canopée) plutôt que la mesure sur base de la plante entière. Cette approche indirecte à l'échelle foliaire apparaît judicieuse pour l'évaluation du statut azoté de la culture et la gestion de sa fertilisation azotée en cours de saison étant donné la stabilité de réponse de la teneur en azote foliaire. En effet, contrairement à la teneur en azote au niveau de la plante qui diminue avec l'accumulation de la matière sèche totale, la teneur en azote au niveau des feuilles supérieures du couvert végétal est plus stable et bien corrélée à l'INN (Lemaire et al., 1997). Cependant pour la culture de pomme de terre, Vos (2009) remarque que la teneur en azote au niveau des feuilles et son évolution en cours de croissance ne sont pas très sensibles à la nutrition azotée de la plante. Ces observations ont conduit à proposer l'hypothèse suivante : en conditions limitantes en azote, la culture de pomme de terre adapte son développement foliaire afin de maintenir sa productivité par unité de surface foliaire. En d'autres termes, sa stratégie pour répondre à la déficience en azote implique que la biomasse végétale est sensible à l'azote tandis que la teneur en azote des feuilles est conservatrice. Le maïs, par exemple, montre la stratégie inverse: sous conditions limitantes en azote, la plante accorde la priorité au maintien de la surface foliaire au détriment de la concentration en azote des feuilles et de la capacité photosynthétique (Vos et al. 2005). Il apparaît ainsi indispensable afin de valider et de calibrer les indicateurs azotés mesurés à l'échelle foliaire, de vérifier leurs réponses, d'une part, sur base du référentiel analytique qu'est l'INN et, d'autre part, sur base des exportations en azote mesurées aussi bien à l'échelle de la biomasse foliaire que de la biomasse de la plante entière.

Puisque ces indicateurs optiques sont non destructifs et que les mesures peuvent être répétées plusieurs fois en cours de saison, les informations sur la dynamique du statut azoté de la culture pourraient être utilisées pour la prise de décision dans la gestion de la fertilisation azotée.

Les qualités requises pour les indicateurs du statut azoté de la culture sont : (i) *la sensibilité*, c'est-à-dire que l'indicateur répond étroitement au statut azoté de la plante et permet idéalement une discrimination entre des niveaux croissants d'engrais azotés minéraux testés; (ii) *la précocité de détection* de l'entrée en carence azotée implique que l'indicateur doit permettre une détection rapide d'une déficience en azote bien avant que des symptômes de chlorose apparaissent au niveau du feuillage et afin d'assurer un délai suffisant pour permettre l'application de doses complémentaires d'engrais azoté (problèmes liés à la forme des fertilisants, à la disponibilité rapide des engrais pour la plante, et aux conditions climatiques) sans entraîner de carence azotée préjudiciable à la qualité et au rendement final de la culture; (iii) *l'exactitude* reflète la répétabilité et la justesse de la mesure et (iiii) *la spécificité* indique qu'idéalement les mesures avec les divers appareils doivent être exclusivement reliées à la fourniture en azote sans interférence avec d'autres facteurs externes (par exemple la variété, l'année d'expérimentation, la date de mesure).

Au niveau du chapitre 4, la comparaison des potentialités des indicateurs foliaires, chlorophylle et composés phénoliques, est étudiée sur base de critères cités plus haut et requis pour l'évaluation du statut azoté de la culture. L'estimation de ces indicateurs repose sur différentes signatures spectrales : la ChlF, la réflectance et la transmittance.

L'INN calculé pour les deux variétés est utilisé au niveau de l'article suivant pour démontrer que les niveaux croissants d'azote testés mènent bien à des quantités croissantes et significativement différentes d'azote prélevé par la biomasse aérienne de la culture. Cet aspect est important puisqu'il confirme des statuts azotés différenciés de la culture correspondant aux doses d'azote appliquées, nécessaires à l'étude des potentialités des outils optiques étudiés dans ce travail. Cependant en l'absence de référence pour Charlotte, seuls les indicateurs potentiels du statut azoté de la culture mesurés pour la variété Bintje sont validés, au niveau de l'annexe 1 du chapitre 4, sur base de l'INN calculé au départ de la courbe critique établie dans nos conditions.

Références bibliographiques

- Ata-Ul-Karim S. T. et al. 2017. Comparison of different critical nitrogen dilution curves for nitrogen diagnosis in rice. *Sci Rep*, 7, 42679.
- Lemaire G., Plénet D. & Grindlay D. 1997. Leaf N Content as an Indicator of Crop N Nutrition Status. In: Lemaire G. (eds) *Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Vos J. P. E. L., Van Der Putten P. E. L., & Birch, C. J. 2005. Effect of nitrogen supply on leaf appearance, leaf growth, leaf nitrogen economy and photosynthetic capacity in maize (*Zea mays* L.). *Field Crops Research*, 93(1), 64-73.
- Vos J. 2009. Nitrogen responses and nitrogen management in potato. *Potato research*, 52(4), 305-317.

Chapitre 4

**Les flavonoïdes comme indicateurs foliaires
du statut azoté de la culture de pomme de
terre**

Chapitre 4. Les flavonoïdes comme indicateurs foliaires du statut azoté de la culture de pomme de terre

Le chapitre 4 a pour but de comparer les potentialités de différents indicateurs optiques non invasifs, appelés « proxies », pour l'évaluation du statut azoté mesuré en plein champ en cours de saison. Les flavonoïdes seuls ou combinés à la chlorophylle sont investigués au départ des mesures de ChlF par comparaison avec d'autres méthodes non invasives de transmittance et de réflectance qui sont généralement utilisées. Les potentialités de la ChlF à savoir la sensibilité de réponse, la précocité de détection, l'exactitude et la spécificité de mesure sont présentées pour la culture de pomme de terre au niveau de l'article publié : [Ben Abdallah F. Philippe W. & Goffart J. P. 2018. Comparison of optical indicators for potato crop nitrogen status assessment including novel approaches based on leaf fluorescence and flavonoid content, *Journal of Plant Nutrition*, 41:(20), 2705-2728, DOI:10.1080/01904167.2018.1510514].

1. Comparison of optical indicators for potato crop nitrogen status assessment including novel approaches based on leaf fluorescence and flavonoid content

F. Ben Abdallah, W. Philippe, J.P. Goffart

*Production and Sectors Department, Crops Production Systems Unit,
Walloon Agricultural Research Centre (CRA-W), Gembloux, Belgium*

E-mail: f.benabdallah@cra.wallonie.be

Telephone: 00 32 (0) 81 62 50 01

Fax: 00 32 (0) 81 61 41 52

Received 20 Sep 2017, Accepted 12 Mar 2018, January 2019. Journal of Plant Nutrition 41(20):2705-2728. DOI:10.1080/01904167.2018.1510514

Abstract. Some phenolic compounds are proposed as good indicators of crop nitrogen status (CNS). This research compared the use of leaf flavonoid content (LFC) as a potential indicator for evaluating potato CNS with other recognised indicators linked to leaf chlorophyll content (LCC). Three-year trials were conducted in Belgium on two potato cultivars including increasing nitrogen rates. Optical sensors (Dualex, Multiplex, Hydro N-tester, CropScan) were used to evaluate LFC and/or LCC. Plant tissue samples were analysed in order to calculate the biomass nitrogen concentration and the nitrogen nutrition index. The indicators were evaluated based on four criteria: the sensitivity; the earliness of the diagnosis; the accuracy; and the specificity. Apart from the low specificity to nitrogen, which can be improved by the use of a within-field reference plot, the LFC (combined with LCC or individually) matched the required criteria and could be suggested as a valuable indicator for assessing potato CNS.

Keywords. leaf flavonoid content, leaf chlorophyll content, nitrogen, potato, optical sensors.

Acknowledgments. This study was funded by the regional Walloon Public Service (SPW, DGO3, Namur) in Belgium. We would like to thank the Walloon Agricultural Research Centre and particularly the Crops Production Systems unit for their assistance with field operations, sampling and analysis and the Food and Feed Quality Unit for providing the analytical measurements of total plant nitrogen concentration. The statistical assistance of Elena Pitchugina and Viviane Planchon is gratefully acknowledged.

1.1. Introduction

Nitrogen (N) is an essential nutrient in plant growth, affecting both yield and quality. Potato crops have low N use efficiency because of the plant's poorly developed root system, which also increases the risk of N loss through leaching. In order to maintain yield and quality and to prevent environmental pollution, the crop's N use efficiency needs to be improved. This implies careful management of N fertilisation by determining the optimum rates and dates of N fertiliser applications.

Relevant N strategies combine splitting the recommended N dose (estimated before planting) and the assessment during growth of the potato crop's N status (CNS) (Goffart et al. 2008).

Several in-season plant-based methods have been developed over the past few decades to assess potato CNS. Such methods can help in deciding about the need for supplementary N fertiliser application. The Nitrogen Nutrition Index (NNI) is a reference method which identifies situations of deficient and non-deficient N used to assess CNS. Establishing the NNI at field level, however, requires destructive and chemical analysis and is not appropriate for a quick assessment of CNS. The NNI can be used as a reference for calibrating other non-invasive methods for the quick and easy in-season monitoring of CNS (Goffart et al. 2008).

These methods imply the use of handheld sensors (Goffart et al. 2008) based on spectral characteristics of leaf transmittance (Vos and Bom 1993), reflectance (Gitelson et al. 1998) and fluorescence (Ben Abdallah et al. 2016 *a*) for the estimation of indicators closely related to the crops' N nutrition. These handheld sensors (chlorophyll-meters for transmittance, radiometers for reflectance and fluorimeters for fluorescence) commonly use the major symptom of N deficiency associated with a decrease of leaf chlorophyll content (LCC). Two major problems have been reported with the use of transmittance-based measurements by chlorophyll-meters (Cerovic et al. 2015). These are the non-linear response of the sensor to optimal and supra-optimal N contents due to the physiological saturation of leaf chlorophyll response to N (Cerovic et al. 2012) and the influence of dry leaf mass per area (LMA), which reduces the accuracy of prediction of leaf N concentration expressed in dry-weight by a surface-based measurement (Peng et al. 1993). The potential advantages of reflectance-based measurements alone are inadequate, in view of delayed sensitivity, lack of specificity to N stresses and potentially erroneous information from non-vegetated soil (Tremblay et al. 2012).

Regarding these problems, phenolic compounds has been proposed as a potential CNS indicator. Flavonoids are a class of phenolic compounds related to plant N content. Nitrogen deficiency induces an increase in leaf flavonoid content (LFC) (Bongue-Bartelsman and Phillips 1995, Stewart et al. 2001). Sensors using chlorophyll fluorescence have been developed to assess LFC, such as the Dualex (Goulas et al. 2004, Cerovic et al. 2005, Cartelat et al. 2005, Tremblay et al. 2007) and Multiplex (Ben Ghazlen et al. 2010, Zhang et al. 2012) fluorimeters. Flavonoids could be used as a surrogate of LMA (Cerovic et al. 2012), since there is a very good

correlation between the two (both are controlled by leaf irradiance) (Meyer et al. 2006).

In addition to the single-indicator approach (LCC or more recently LFC), a double-indicator approach that combines the detection of LCC and LFC as a ratio of chlorophyll to flavonoids has been suggested as a promising approach for assessing CNS (Cartelat et al. 2005, Tremblay et al. 2007, Tremblay et al. 2009, Agati et al. 2013). Research by Cartelat et al. (2005) on winter wheat concluded that the combined ratio would alleviate, at least partially, the problem of chlorophyll and flavonoids gradients along leaves. This ratio was proposed as a solution for preventing the influence of LMA, because the unit of expression becomes irrelevant (Cerovic et al. 2012). It also improves discrimination between levels of CNS because of the opposite effect of N nutrition on chlorophyll and flavonoids (Cartelat et al. 2005, Tremblay et al. 2007), with the result that LCC decreases with decreasing leaf N content, whereas LFC increases with increasing leaf N content.

The objective of the current study was to evaluate the potential of LFC, alone or combined with LCC, in the assessment of potato CNS. Based on a comparative study of indices provided by various optical sensors, four criteria were considered for assessing the potential of LFC: 1) the sensitivity of the readings; 2) the earliness of the diagnosis of CNS; 3) the accuracy (precision and repeatability) of the readings; and 4) the specificity of the indices. This paper describes the results of a three-year trial (2012, 2013 and 2014) including two potato cultivars in Belgian conditions.

1.2. Material and methods

1.2.1. Field trials and experimental design

A first type of experiment was conducted at the experimental site of the Walloon Agriculture Research Center in Gembloux, Belgium in 2012 and 2013. The experiments included two potato [*Solanum tuberosum* (L.)] cultivars, Charlotte and Bintje (early and mid-early cultivars respectively) and six increasing N fertiliser rates for each cultivar. The trial cropping characteristics are given in Table 4. The experimental design was a split plot with four replications. The cultivar was the main-plot factor and N treatment was the subplot factor. Each subplot was eight rows wide and divided into two parts. The first part was used for the optical readings and plant sampling during the season; the second part was used for the assessment of final yield. Only the four central rows of each plot were considered for readings and sampling, avoiding the border rows. A second type of experiment was also conducted in 2014 in Gembloux to confirm the results of the first two years' preliminary trials. The trial included the same cultivars and four increasing N rates with the same N fertiliser (Table 4).

Ammonium nitrate fertiliser (ANF, solid granules, 27% N + 4% MgO) was broadcast and incorporated at planting. Phosphorus (P) and potassium (K) fertilisers were applied before planting at rates of 70-80 kg P₂O₅ ha⁻¹ and 250-300 kg K₂O ha⁻¹. Trials were rain fed.

Table 4. Crop and soil characteristics of the three-year trials conducted at the Walloon Agriculture Research Center in Gembloux, Belgium.

Year	2012		2013		2014	
Type of soil	Clay loam		Clay loam		Clay loam	
Previous crop	Cereal crop		Cereal crop		Cereal crop	
Cultivar	Bintje	Charlotte	Bintje	Charlotte	Bintje	Charlotte
Organic matter (%)	2.2	2.2	1.3	1.3	2.1	2.1
Soil mineral N (kg/ha)	46	46	36	36	72	72
Planting density (m ² m)	0.75*0.35		0.75*0.35		0.75*0.35	
Applied N (kg.ha ⁻¹)	0-50-100-150-200-250		0-50-100-150-200-250		0-100-200-250	
Planting date	13/05	13/05	25/04	25/04	15/04	15/04
Emergence date	2/06	1/06	7/06	5/06	21/05	18/05
Harvest date	01/10	10/09	23/09	3/09	23/09	02/09

1.2.2. Soil and weather data acquisition

The soil mineral nitrogen content was assessed using the method developed by Guiot *et al.* (1993). The trials were rain fed and the soil water content was monitored during the growing season using soil tensiometer probes (Watermark probes, Irrrometer Company, California) in order to detect drought stress periods. The mean water tension values (expressed in kPa) of six probes placed at a depth of 25 cm from the top of the ridge were recorded. The probes were distributed uniformly across the experimental field. Daily precipitation (l m⁻²) and air temperature (°C) were recorded at an official weather station (Belgian Royal Meteorological Institute, IRM) located near the experimental field. These data related to crop conditions are relevant to demonstrate that the performances of the optical indicators were tested under different cropping season's conditions.

1.2.3. Optical data collection and analysis

Optical readings were carried out weekly during the crop growth period from mid-June to the end of July for the three years (Table 5). The measurements were collected for each year at the same date or at the closest date for both cultivars. All the readings were made on plants with a uniform appearance within each plot and at the same plant development stages with the various tested sensors, but not necessarily on the same leaves or plants. Similarly, readings were not taken on the same leaves or plants on different dates.

The optical sensors tested in this study were: the chlorophyll-meter Hydro N-Tester (Yara, Oslo, Norway), the fluorimeters Dualex and Multiplex 375 (Force-A, Orsay, France), and for 2012 and 2013 trials the radiometer CropScan (CropScan Inc, Rochester, USA). The collected raw signals and calculated indices are summarised in Table 6.

Table 5. Measurement dates for optical sensors used in this study.

Optical measurement dates ^a					
2012		2013		2014	
Charlotte	Bintje	Charlotte	Bintje	Charlotte	Bintje
-	-	11/06 (7)	14/06 (8)	11/06 (25)	11/06 (22)
19/06 (19)	20/06 (19)	17/06 (13)	19/06 (13)	16/06 (30)	18/06 (29)
25/06 (25)	26/06 (25)	24/06 (20)	26/06 (20)	26/06 (40)	26/06 (37)
02/07 (32)	03/07 (32)	01/07 (27)	04/07 (28)	30/06 (44)	03/07 (44)
09/07 (39)	10/07 (39)	08/07 (34)	10/07 (34)	17/07 (61)	17/07 (58)
16/07 (46)	17/07 (46)	15/07 (41)	18/07 (42)	24/07 (68)	24/07 (65)
23/07 (53)	24/07 (53)	22/07 (48)	24/07 (48)	29/07 (73)	31/07 (72)

^a Measurements provided with the Hydro N-Tester (HNT, Yara, Oslo, Norway), Dualex, Multiplex (Force-A, Orsay, France), and for 2012 and 2013 trials with CropScan (CropScan Inc, Rochester, USA), Numbers in parentheses indicate the day after emergence (DAE) of the crop.

The Hydro N-Tester chlorophyll-meter and the Dualex fluorimeter are hand-held leaf clip sensors (corresponding to leaf areas of 2-3 mm² and 19-20 mm² per reading respectively). Single readings were taken on the distal leaflet of the first fully developed leaf from the top of the canopy (corresponding to the fourth or fifth leaf from the apex of a main stem), avoiding midribs. The measurements focused on the upper face of the leaf. On each date, 30 individual readings were collected for each plot and averaged across the replications of the same N treatment.

Both sensors provided indices related to the LCC expressed as HNT index (Hydro N-Tester) and as CHL index (Dualex) (Table 6). The measurements are based on the transmittance of two wavelengths, red (R) and near-infrared (NIR). The R wavelength is absorbed by chlorophyll, whereas for the NIR wavelength no absorption occurs for chlorophyll; absorption is then related to leaf water content and leaf cell wall structure. The R and NIR wavelengths provided by the Hydro N-Tester are 650 nm and 940 nm respectively. However, the R and NIR wavelengths provided by the Dualex are 710 nm and 850 nm respectively. The R wavelength provided by the Hydro N-Tester is characterised by a large chlorophyll absorption coefficient, whereas the R wavelength provided by the Dualex is characterised by a small chlorophyll absorption coefficient (Cerovic et al. 2012). Using an R wavelength with a large chlorophyll absorption coefficient increases the accuracy at low LCC and reduces the accuracy at high LCC. An R wavelength with a small chlorophyll absorption coefficient reduces the accuracy over the whole range of LCC but lessens the problem of saturation in the high chlorophyll range (Cerovic et al. 2012).

The Dualex sensor provides a second index, the FLV index (Table 6), which enables the estimation of LFC using the fluorescence emitted by chlorophyll. This fluorescence is induced by two excitation wavelengths: one in the UV (375 nm) wavelength and the other one in the R (650 nm) wavelength. The absorbance of leaf flavonoids is then determined by measuring the fluorescence excitation ratio FRF-UV/FRF-R, where FRF-UV is the far-red fluorescence detected following UV excitation and FRF-R is the far-red fluorescence detected following R excitation (Goulas et al. 2004). This approach is based on the UV screening properties of flavonoids (Bilger et al. 1997). The UV wavelength is absorbed by flavonoids located mainly in the leaf epidermis, therefore reducing the amount of light available for chlorophyll fluorescence. The reference wavelength in R goes through the epidermis without being absorbed by flavonoids and reaches the leaf mesophyll, where it is absorbed by chlorophyll. The third index provided by the Dualex device is the NBI index, calculated as the CHL/FLV ratio.

The Multiplex 375 fluorimeter is a handheld multi-parametric fluorescence sensor for measurements on leaves using a near-remote sensing approach. The sensor generates four excitations in the UV (375 nm), blue (B, 470 nm), green (G, 515 nm) and R (635 nm) wavelengths and detects yellow (YF, 590 nm), red (RF, 685 nm) and far-red (FRF, 735 nm) fluorescence (Ben Ghazlen et al. 2010). Measurement distance to leaves is 10 cm from active light sources and the impacted leaf area is 50 cm². The sensor was held facing downwards, perpendicular to the leaf surface. The Multiplex readings were taken on sets of fully developed leaves from the top of the canopy, as with the Dualex and Hydro N-tester readings. On each date, 30 individual measurements were taken in each plot and averaged across the replications of the same N treatment.

Several fluorescence ratios from the various wavelengths were computed directly using the Multiplex device to supply information related to leaf chlorophyll and flavonoid contents (Table 6). The Multiplex LCC was estimated using the SFR-R index, defined as the simple fluorescence emission ratio between FRF and RF induced under R excitation. This parameter is based on increasing chlorophyll fluorescence re-absorption at its shorter wavelength peak when chlorophyll content increases (Buschmann 2007). The Multiplex LFC was estimated using the FLAV index, which is based on the same principle of fluorescence excitation ratio as the Dualex FLV index. However a difference exists between the two devices: in the Dualex, the use of an electronic feedback loop avoids the variable chlorophyll fluorescence, while in the Multiplex there is no feedback loop. The feedback loop minimises the difference between variable chlorophyll fluorescence induced under R and UV excitation (Goulas et al. 2004). In the Multiplex, thanks to the rapid alternating light sources between the two excitations, the fluorescence induced under R and UV excitation remains constant.

The NBI-G and NBI-R indices were provided by the Multiplex and related to both leaf chlorophyll and flavonoids content.

The HNT/FLV and HNT/FLAV indices (Table 6) were also calculated as combined ratios between the chlorophyll index provided using the Hydro N-Tester

device and the flavonoid index provided by the Dualex or Multiplex sensors respectively.

The Cropscan radiometer is a passive near-remote sensing device used for measuring crop light reflectance. The radiometer is extended on a boom at a height of 2 m above the ground (approx. 1.5 m above the top of the canopy), providing a circular measurement area of 1 m in diameter at ground level.

The Cropscan readings were taken between noon and 2.00 pm (GMT). The radiometer faced downwards, perpendicular to the crop surface (nadir view). On each date, five measurements were made within each plot and averaged across the replications.

The sensor allowed eight wavebands of 15 nm wide to be used, with central values from 460 nm to 810 nm at 50 nm intervals. Total solar light irradiance and individual wavelength radiance were stored for each waveband, allowing the calculation of canopy reflectance as the ratio between radiance and irradiance. Reflectance at selected wavelengths is related to LCC. Leaves with the lowest chlorophyll contents have higher reflectance in the visible wavelengths and lower reflectance in the NIR wavelengths than leaves with higher chlorophyll levels (Daughtry et al. 2000).

The G, R and NIR indices of the Cropscan (Table 6) were computed as canopy reflectance in the G (mean reflectance of the 510 and 560 nm bands), R (mean reflectance of the 610 and 660 nm bands) and NIR wavebands (mean reflectance of the 760 and 810 nm bands) respectively (Goffart et al. 2010). Spectral Vegetation Indices (VIs) were also computed by combining the low reflectance in the visible wavelengths with the high reflectance of the NIR wavelengths in order to minimise the extraneous factors (Daughtry et al. 2000).

Table 6. Description of the N-indices provided by the different optical sensors used in this study.

Optical sensors ^a	Index	Description	Excitation	Formula
Duaalex	FRF-R	Far Red Fluorescence (FRF)	Red (R)	-
	FRF-UV	Far Red Fluorescence (FRF)	Ultraviolet (UV)	-
	T ₇₁₀	Transmittance	R	-
	T ₈₅₀	Transmittance	Infra-Red (IR)	-
	CHL	Transmittance (Chlorophyll)	R and IR	$(1/T_{850}) - (1/T_{710})$
	FLV	Fluorescence (Flavonoids)	R and UV	$\text{Log}(\text{FRF-R}/\text{FRF-UV})$
	NBI	Nitrogen Balance Index	-	CHL /FLV
Multiplex	FRF-G	Far Red Fluorescence (FRF)	Green (G)	-
	FRF-R	Far Red Fluorescence (FRF)	R	-
	FRF-UV	Far Red Fluorescence (FRF)	UV	-
	RF-G	Red Fluorescence (RF)	G	-
	RF-R	Red Fluorescence (RF)	R	-
	SFR-G	Simple Fluorescence Ratio (Chlorophyll)	G	FRF-G/RF-G
	SFR-R	Simple Fluorescence Ratio (Chlorophyll)	R	FRF-R/RF-R
	FLAV	Fluorescence (Flavonoids)	R and UV	$\text{Log}(\text{FRF-R}/\text{FRF-UV})$
	NBI-G	Nitrogen Balance Index		SFR-G/FLAV
	NBI-R	Nitrogen Balance Index		SFR-R/FLAV
	Hydro N tester	HNT	Transmittance (Chlorophyll)	R and IR
Hydro N tester and Duaalex	HNT/FLV	Combined ratio of chlorophyll and flavonoid indicators		HNT/FLV
Hydro N tester and Multiplex	HNT/FLAV	Combined ratio of chlorophyll and flavonoid indicators		HNT/FLAV

Table 6. to be continued

Optical sensors ^a	Index	Description	Excitation	Formula
Cropscan	460	Reflectance (Chlorophyll)	no excitation source (use the solar light)	$(RE_{460} / I_{460}) * 100$
	510	I _x : Incident light of different x wavelengths		$(RE_{510} / I_{510}) * 100$
	560	RE _x : Reflected light of different x wavelengths		$(RE_{560} / I_{560}) * 100$
	610			$(RE_{610} / I_{610}) * 100$
	660			$(RE_{660} / I_{660}) * 100$
	710			$(RE_{710} / I_{710}) * 100$
	760			$(RE_{760} / I_{760}) * 100$
	810			$(RE_{810} / I_{810}) * 100$
	G	Reflectance in green	-	$[(RE_{510} / I_{510}) * 100]$ + $[(RE_{560} / I_{560}) * 100] / 2$
	R	Reflectance in red	-	$[(RE_{610} / I_{610}) * 100]$ + $[(RE_{660} / I_{660}) * 100] / 2$
NIR	Reflectance in near- infra-red	-	$[(RE_{760} / I_{760}) * 100]$ + $[(RE_{810} / I_{810}) * 100] / 2$	
NormG	Normalised indices		$G / (NIR + R + G)$	
NormR		$R / (NIR + R + G)$		
NormNIR		$NIR / (NIR + R + G)$		
DVI		$NIR - R$		
GDVI	$NIR - G$			
RVI	NIR / R			
GRVI	NIR / G			
NDVI	$(NIR - R) / (NIR + R)$			
GNDVI	$(NIR - G) / (NIR + G)$			
SAVI	Vegetation indices		$((NIR - R) / (NIR + R + 0.5)) * 1.5$	
GSAVI		$((NIR - G) / (NIR + G + 0.5)) * 1.5$		
OSAVI		$(NIR - R) / (NIR + R + 0.16)$		
GOSAVI		$(NIR - G) / (NIR + G + 0.16)$		

^a Hydro N-Tester (HNT, Yara, Oslo, Norway), Cropscan (Cropscan Inc, Rochester, USA), Dualex and Multiplex (Force-A, Orsay, France).

1.2.4. Plant sample collection and analysis

Plant samples were collected in 2012, 2013 and 2014 (Table 7). The plant samplings were performed at the same date or close to the date of the optical measurements in order to compare the provided indices with the reference analytical method. Within each plot, eight whole plants were collected and taken to the laboratory. The plants were washed, air-dried and weighed in order to determine the fresh weight of the shoots (leaves + stems), roots and tubers. Subsamples of each plant part were then dried at 80° C up to constant dry weight. The dry matter (DM) content of each sample was then calculated.

Table 7. Plant sampling dates in 2012, 2013 and 2014 trials.

Sampling dates					
2012		2013		2014	
Charlotte	Bintje	Charlotte	Bintje	Charlotte	Bintje
27/06 (27)	27/06 (26)	17/06 (13)	19/06 (13)	16/06(30)	18/06 (29)
02/07 (32)	04/07 (33)	24/06 (20)	26/06 (20)	30/06 (40)	03/07(44)
09/07 (39)	11/07 (40)	01/07 (27)	11/07 (35)	28/07 (72)	30/07 (71)
16/07 (46)	25/07 (54)	15/07 (41)	23/07 (47)	-	-

Numbers in brackets indicate the day after emergence (DAE) of the crop.

From the various plant parts (leaves + stems, tubers and roots), finely crushed samples with a Cyclotec 1093 sample mill (FOSS Tecator) were subjected to analytical measurements of total N concentration conducted with NIR spectroscopy using a FOSS-NIR Systems 6500 scanning instrument (NIR-Systems, Silver Springs, MD) and calibrated using the Dumas Combustion method (LECO, St Joseph MI, USA) and the statistical method developed by Shenk and Westerhaus (1993). The NNI, defined as the ratio between the measured N concentration in shoots and tubers and the predicted critical N concentration (N_c), was calculated according to the N_c dilution curve ($N_c (\%) = 5.37 W^{-0.45}$, W is the shoot and tuber biomass expressed in $t DM ha^{-1}$) developed for the Bintje potato cultivar under Belgian conditions (Ben Abdallah et al. 2016 b). In the absence of a reference N_c curve for Charlotte, the NNI for this cultivar was calculated in this study using the same equation as for Bintje. The NNI was measured for each sampling date, and then an average was calculated across the period between 20 and 55 DAE. The NNIs for Bintje were compared to a reference value of 1.16. This reference of 1.16 is considered as the threshold value, to be achieved during the optimal period for CNS assessment; below this value, the CNS is considered as deficient with respect to maximum potential yields (Ben Abdallah et al. 2016 b). Since differences in the N_c curve could exist between cultivars with different earliness (Ben Abdallah et al. 2016 b), the obtained NNI for Charlotte was not used in this study to define the

optimal N status (considering the reference value of 1.16), but used in order to demonstrate that the applied N fertiliser rate leads to different N status.

1.2.5. Yield measurements

Harvesting was done on the two central rows (8 m long for 2012 and 6 m long for 2013 and 2014) for each plot. The tubers harvested were used to measure yield, DM content (expressed in %) using the tuber underwater weigher (Robbe potato underwater weigher 9306, Belgium) and nitrate content using a hand-held electronic test meter (Nitrachek 404, KPG Products Ltd, UK).

1.2.6. Assessment of the required criteria for the different studied indices

To fully evaluate the usefulness of the optical indices from the readings for predicting the CNS, it was necessary to assess the sensitivity of the indices, their earliness for N diagnosis, their accuracy and their specificity. The sensitivity of an index indicates if it reacts to a change in the N treatment level. The earliness of the response suggests that the index should give an early detection of N deficiency, long before visual symptoms of chlorosis appear in the foliage. The accuracy of an index means that the readings related to the N status are near to the true value (precision) and repeatable (repeatability). Specificity to N means that the measurement should ideally be exclusively related to nitrogen status without interference from other external factors. These criteria are expected in order to adequately assess the CNS (Goffart et al. 2008).

1.2.7. Data analysis

The statistical analysis was performed with the SAS software package (SAS 9.4). The studied indices were subjected to analysis of variance (ANOVA, proc glm) in order to study the sensitivity and earliness of the diagnosis on the basis of the N effect. The indices' responses to increasing N rates were studied across the sampling period including the two trial years (2012 and 2013) and both cultivars as a whole. For this analysis, the first measurement dates for 2013 for both cultivars were excluded, since no measurements were performed for the analogous period in 2012. The obtained indices evaluated for each sampling date and for each cultivar were then subjected to ANOVA (all the measurements were included). In order to confirm the results of the two trial years, the responses of the retained LFC indicators (individually and combined to LCC) to increasing N rates were also studied for the 2014 trial.

As a complement, a ratio of sensitivity (RS) for each index was calculated in order to evaluate the ability of the index to assess highly contrasting N status. This method is similar to that proposed by Zhang et al. (2012). The RS was calculated between the value of the higher N treatment (250 N) divided by the value of the lowest N treatment (0 N) for each index. If the index value corresponding to the 0 N treatment was higher than the index value corresponding to the 250 N treatment, the reciprocal

calculation of the ratio was made. These ratios were calculated for each index in the two trial years (2012 and 2013) including the cultivars and the measurements dates as a whole. The RS was also calculated for 2014 trial including the cultivars and the measurements dates as a whole.

The relationship between the optical indices and N concentration in shoots or in the whole plant biomass were investigated using the Pearson correlation coefficients (SAS) in order to assess the precision of the indices for the 2012 and 2013 trials.

The repeatability in this study was evaluated by the coefficient of variation of the indices (%), calculated as the ratio between the standard deviation and the mean of the indices measured between the four replications by date (for both the 2012 and the 2013 trials) and combining the six levels of N rates.

The effects of different factors, such as the N, the cultivar, the year, the DAE and their interaction, were investigated to assess the specificity of the studied indices (absolute and relative indices). Unless specified otherwise, the provided optical indices were studied on the basis of absolute mean, absolute indices, obtained from the replicated plots average for the same N treatment. The relative indices were calculated using a within-trial reference plot: the well-fertilised reference plot (ratio of the absolute index for a given N treatment to the absolute index for the 250 N treatment) or the control reference plot (ratio of the absolute index for a given N treatment to the absolute index for the 0 N treatment). Specificity was investigated in the three trial years, including only measurements performed in analogous periods for 2012, 2013 and 2014. The absolute indices were compared to the relative indices on the basis of the ANOVA P values and the associated F ratio (Fisher–Snedecor ratio). For factors with significant P values, the F values of the index obtained for the different factors were compared in order to weight the effect of each factor. This method is similar to that proposed by Froidmont et al. (2013): a large F ratio signifies a small probability that the null hypothesis is true. Therefore, the higher the F ratio, the lower the probability.

1.3. Results and discussion

1.3.1. Local soil and weather conditions

The 2012 trial was characterised by relatively high precipitations in April, June and July and low precipitation in May, August and September (Figure 15a). The sum of precipitation recorded from April to September 2012 was 382.0 mm versus a normal precipitation sum of 405.2 mm. Except for the month of May, the 2013 trial experienced low precipitation (Figure 15a), with a sum of precipitation of 335.6 mm from April to September. Unusual rainy days were recorded in July and August for the 2014 trial (a sum of 496.7 mm from April to September) (Figure 15a). The sum of air temperature recorded for the three years' growing seasons was slightly higher than the normal, particularly for 2014, when high temperatures were observed in April, July and September (Figure 15a). The sum of air temperature recorded from April to September was 86.4 °C in 2012, 85.4°C in 2013 and 90.4°C in 2014 versus a normal temperature sum of 84.6°C.

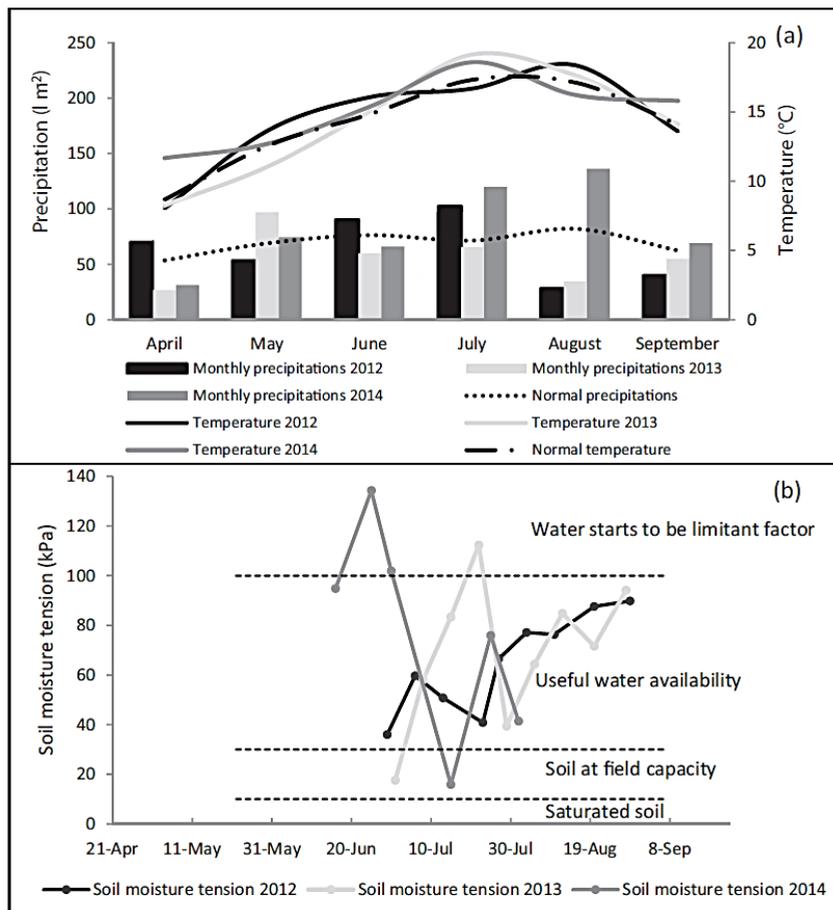


Figure 15. a) Total monthly rainfall ($l\ m^{-2}$) and mean monthly temperature ($^{\circ}C$) data collected from the official meteorological station of the Belgian Royal Meteorological Institute (IRM) in Gembloux-Ernage (near the location of the trials), and (b) mean soil moisture tension (kPa) recorded from soil tensiometer probes (Watermark probes, Irrrometer Company, California) at a depth of 25 cm from the top of the ridge. Data collected for 2012, 2013 and 2014 trials.

From the end of June to the end of July, corresponding to the main period of measurements with the different optical tools and of plant sampling, the soil water tension for 2012 (Figure 15b) ranged between 30 and 100 kPa, indicating sufficient water availability (linked to the high precipitation observed in Figure 15a) to cover crop water needs. For the 2013 trial, the soil water tension (Figure 15b) mostly indicated a range corresponding to available water content except for a recorded value over 100 kPa on 22 July. For the 2014 trial, values between 95 and 134 kPa were recorded (Figure 15b) during two weeks around mid-June and early July. During this short period, water availability was probably a limiting factor for optimal crop growth and development. Thanks to the precipitation recorded especially at the end of June, the soil moisture tension then decreased up to the range

of available water content. For the 2012 and 2013 trials, the period from mid-August to mid-September was clearly dry (Figure 15a) and the corresponding water supply became quite limited. For this analogous period, the soil moisture was not measured for the 2014 trial, but the higher precipitation observed in Figure 15a could suggest that the water supply was not a limiting factor.

1.3.2. Effect of N rate on tuber yield and quality

A statistical yield response to N rates was observed particularly between the control treatment (0 N) and higher tested N treatments (Figure 16). Differences among the higher N rates were not significant. For both cultivars, the relationship between yield and N applied was characterised by an increase of the yield with initial increments of N rates, reaching a plateau once N levels increased beyond an optimal level. Similar N response patterns for potatoes have been reported (Westermann and Kleinkopf 1985, Lewis and Love 1994, Long et al. 2004), although in some cases and for some cultivars yields decline beyond an optimal level rather than reaching a plateau (Westermann et al. 1994, Long et al. 2004).

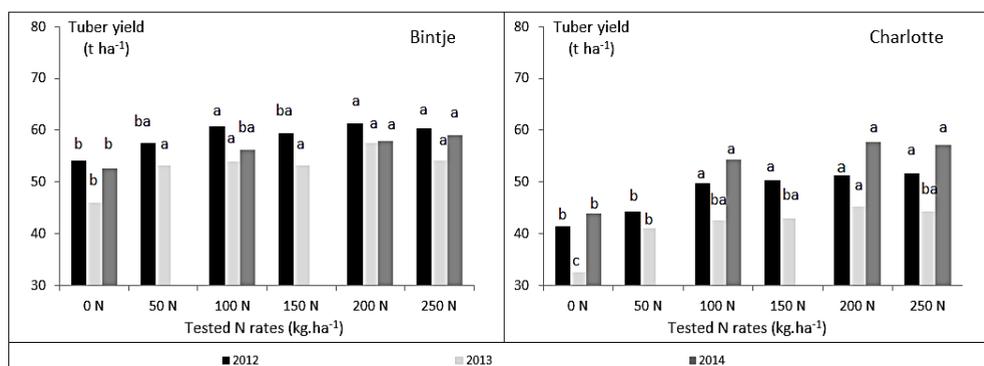


Figure 16. Tuber yield response to increasing N fertiliser rates in potato crop trials on loam soil in the Gembloux area for two potato cultivars, Bintje and Charlotte (2012, 2013 and 2014 data).

Within each year, N treatments with the same letter are not significantly different at 0.05 level (Student-Newman-Keuls method).

The nitrate and dry matter contents are indicators of tuber quality generally influenced by N fertilisers. The increase in N fertiliser rates clearly increased tuber nitrate content (statistically significant N effect) and less obviously decreased the dry matter content (Table 8).

Table 8. The effect of N fertiliser rates on nitrate content (mg kg⁻¹ fresh weight, FW) and dry matter of tubers (%).

	N rates	Nitrate content (mg kg ⁻¹ FW)			Dry matter (%)		
		2012	2013	2014	2012	2013	2014
Bintje	0	20 ^c	34 ^e	29 ^d	25 ^a	22 ^a	24 ^a
	50	31 ^c	53 ^{d,e}		25 ^a	22 ^{a,b}	
	100	57 ^b	86 ^{c,d}	49 ^c	24 ^b	21 ^{a,b,c}	23 ^b
	150	64 ^b	117 ^{c,d}		24 ^b	21 ^{b,c}	
	200	92 ^a	133 ^b	92 ^b	23 ^b	20 ^c	21 ^c
	250	98 ^a	190 ^a	106 ^a	23 ^b	20 ^c	21 ^c
Charlotte	0	47 ^c	100 ^e	85 ^c	22 ^a	20 ^a	20 ^b
	50	51 ^c	147 ^d		21 ^a	20 ^{a,b}	
	100	63 ^{c,b}	208 ^c	94 ^c	21 ^a	19 ^b	21 ^a
	150	75 ^b	265 ^b		21 ^a	19 ^{b,c}	
	200	101 ^a	298 ^a	165 ^b	21 ^a	18 ^c	20 ^b
	250	107 ^a	307 ^a	228 ^a	21 ^a	18 ^c	19 ^c

Within each year and cultivar, N treatments with the same letter are not significantly different at 0.05 level (Student-Newman-Keuls method).

1.3.3. Effect of N rate on the Nitrogen Nutrition Index (NNI)

The NNI measured across the sampling dates between 20 and 55 DAE for the three trial years is shown in Figure 17. For Bintje, NNI ranged from 0.70 to 1.28 in 2012, from 0.71 to 1.27 in 2013 and from 0.80 to 1.12 in 2014. For Charlotte, NNI showed the same range of values as Bintje (from 0.80 to 1.31 in 2012, from 0.70 to 1.27 in 2013 and from 0.78 to 1.18 in 2014). In the 2012 trial, for example, the value of NNI was <1.16 for 0, 50 and 100 N levels, indicating N deficiency situations. The NNI was almost equal to 1.16 for the 150 N level, indicating an optimum N status and >1.16 for 200 and 250 N levels, showing situations of N excess.

The NNI calculated for both cultivars showed statistical difference in the N status, indicating different N uptake according to the N fertiliser rate (Figure 17). The evaluation of tuber yield and quality and especially the NNI enabled the determination of the crop's N response. This is an important aspect confirming that the studied N treatments led to different N status; sensitive optical readings would therefore allow similar N discrimination.

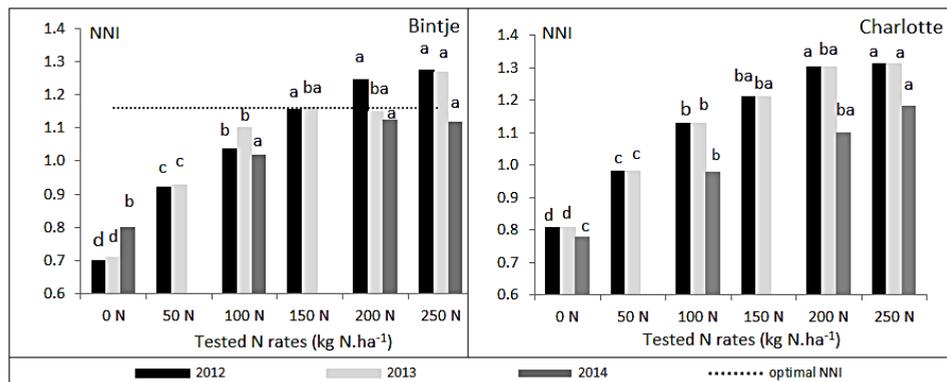


Figure 17. Nitrogen Nutrition Index (NNI) measured across the sampling period (between 20 and 55 DAE) for increasing N rates (kg N ha^{-1}) at the site of Gembloux in 2012, 2013 and 2014 for Bintje and Charlotte cultivars.

The dotted horizontal line represents a reference NNI of 1.16 obtained from Ben Abdallah et al. (2016b) to maximise tuber yield for the cultivar Bintje. Within each year, N treatments with the same letter are not significantly different at 0.05 level (Student-Newman-Keuls method).

1.3.4. Comparison of the studied indices based on their sensitivity, earliness of diagnosis, accuracy and specificity

1.3.4.1. Sensitivity

- Effect of N rate on N indices across the sampling period

Except for SFR-G, the statistical analysis showed that all the studied indices were significantly influenced by applied N rates (Table 9) among the studied cultivars and across the sampling period (both 2012 and 2013 trials).

Chlorophyll-based indices. The CHL, HNT and the SFR-R indices decreased with the decrease of N rates (Table 9). This relationship is in accordance with the reported decrease of LCC under N deficiency conditions. The CHL index was able to reveal significant differences among the five studied N rates. The HNT was able to reveal significant differences among all six studied N rates. The SFR-R index was able to reveal significant differences among the four studied N rates. Higher average values of R and G indices were obtained for the control treatment (0 N) compared with the other N rates, whereas the NIR index showed the opposite response to N rates (Table 9). This opposite dependence on N rates is explained by the spectral signature that has also been reported by Daughtry et al. (2000) and Goffart et al. (2010). The normalised indices (NormG, NormR and NormNIR) showed similar trends to N rates compared to their corresponding reflectance indices (respectively G, R and NIR). The VI increased with N rates (Table 9). The response of VI, compared to the G, R and NIR indices, seems to be more sensitive to N, particularly for the GRVI index, which revealed significant differences among the four studied N rates. Compared to some computed VIs (e.g., OSAVI and RVI), the GRVI index (calculated at 550 and 801) responded more to LCC (Daughtry et al. 2000) and then to leaf N content.

Flavonoid-based indices. The FLV and FLAV indices increased from the N-fertilised treatments to the control treatment (Table 9). This is in agreement with the theory relating increases in LFC to higher N stress levels. Previous studies have revealed this inverse relationship between LFC and increasing N rates (Cartelat et al. 2005, Tremblay et al. 2007, Zhang et al. 2012). Both of the flavonoid indices were able to reveal significant N effect. The N differences were observed among all the studied N rates case of FLV and among five studied N rates cases of FLAV.

Chlorophyll- and flavonoid-based indices. The NBI, NBI-G, NBI-R, HNT/FLV and HNT/FLAV indices increased from the control treatment (0 N) up to the treatments with higher N applications (Table 9). As N rates increased, LCC increased and LFC decreased, thus explaining the increase in these combined chlorophyll- and flavonoid-based indices. These indices were able to reveal significant N responses among all the studied N rates, except for NBI-G (statistical difference between five N rates).

Taking into account the computed RS, differences in the sensitivity of the studied indices to N rates can be observed (Table 9). The higher the ratio between high and low N, the higher the sensitivity of the corresponding index. The degree of contrast between low and high N conditions was expressed by the index in this order: NBI-R > NBI-G > NBI > HNT/FLV > HNT/FLAV > RVI > FLV > FLAV > GRVI > NormR, GDVI > DVI > R > CHL, NIR, NormG > HNT > NDVI, SAVI > GNDVI, GSAVI, GOSAVI > G, OSAVI > SFR-R, NormNIR > SFR-G. The combined chlorophyll- and flavonoid-based indices (NBI-R, NBI-G, NBI, HNT/FLV and HNT/FLAV) were ranked as better able to react to a range of contrasting N conditions, followed by the RVI index and then both the flavonoid indicators (FLV and FLAV). The HNT index was ranked 17 on the list of 27 indices. This result is in accordance with other reports of the superior sensitivity of the combined chlorophyll- and flavonoid-based indices than either of the two indicators used individually (Cartelat et al. 2005, Cerovic et al. 2005, Tremblay et al. 2007, Cerovic et al. 2012).

- **Effect of N rate on N indices per sampling date**

NBI-R, HNT/FLV, HNT/FLAV and FLV revealed a significant N response for all the sampling dates and for both trials (Table 10). As a complement the figures from 18 to 21 (in the Annex 1) present the responses of the previous indicators during the measurement period at different rates of nitrogen availability*.

The NBI and FLAV indices were also strongly influenced by N rates, but with one exception in 2012 the N effect was not significant. This was the case at the beginning of measurement for the NBI (Charlotte at 19 DAE) and at the end of measurement for the FLAV index (Bintje at 53 DAE).

The HNT index showed sensitive response on all the sampling dates for Bintje in 2013. For Charlotte in 2013 at 14 DAE, the N response of HNT index was not significant. For the 2012 trial, the HNT index showed late N response (Table 10).

*additional information compared to the published paper

Table 9. Reading responses of different optical indices (see description in Table 6) to increasing N fertiliser rates including the sampling period (both 2012 and 2013 trials) and potato cultivars (Bintje and Charlotte) as a whole.

	N effect								
	ANOVA test ^a		Multiple-Comparison test ^b						RS ^c
	F value	Pr	Tested N rates (kg ha ⁻¹)						
			0 N	50 N	100 N	150 N	200 N	250 N	
NBI-R	263	***	0.77 ^f	0.92 ^e	1.10 ^d	1.18 ^c	1.22 ^b	1.29 ^a	1.68
NBI-G	73	***	2.62 ^e	3.07 ^d	3.64 ^c	3.82 ^{c,b}	3.95 ^b	4.24 ^a	1.62
NBI	355	***	24.80 ^f	28.59 ^e	32.36 ^d	34.88 ^c	36.19 ^b	37.62 ^a	1.52
HNT/FLV	389	***	32.75 ^f	37.41 ^e	42.34 ^d	44.77 ^c	46.68 ^b	48.50 ^a	1.48
HNT/FLAV	341	***	40.72 ^f	46.46 ^e	52.20 ^d	55.66 ^c	57.48 ^b	59.89 ^a	1.47
RVI	32	***	9.78 ^c	11.82 ^b	13.20 ^a	13.30 ^a	14.23 ^a	14.23 ^a	1.46
FLV	358	**	1.26 ^a	1.17 ^b	1.07 ^c	1.02 ^d	0.99 ^e	0.96 ^f	1.31
FLAV	180	***	1.01 ^a	0.93 ^b	0.87 ^c	0.83 ^d	0.81 ^d	0.78 ^e	1.29
GRVI	148	***	6.08 ^e	7.02 ^d	7.45 ^c	7.58 ^{c,b}	7.73 ^{b,a}	7.79 ^a	1.28
NormR	84	***	0.10 ^a	0.08 ^b	0.08 ^c	0.08 ^c	0.08 ^c	0.08 ^c	1.25
GDAVI	65	***	38.75 ^c	43.97 ^b	46.40 ^a	46.89 ^a	47.88 ^a	47.68 ^a	1.25
DVI	58	***	41.05 ^c	46.63 ^b	49.28 ^a	49.53 ^a	50.75 ^a	50.47 ^a	1.23
R	72	***	5.59 ^a	4.96 ^b	4.73 ^c	4.76 ^c	4.68 ^c	4.61 ^c	1.21
CHL	126	***	29.02 ^e	30.60 ^d	31.96 ^c	33.29 ^b	33.80 ^{b,a}	34.24 ^a	1.18
NIR	49	***	46.64 ^c	51.55 ^b	54.00 ^a	54.34 ^a	55.27 ^a	55.02 ^a	1.18
NormG	123	***	0.13 ^a	0.12 ^b	0.12 ^c	0.12 ^c	0.11 ^c	0.11 ^c	1.18
HNT	162	***	39.09 ^f	40.87 ^e	42.61 ^d	43.41 ^c	44.14 ^b	44.71 ^a	1.14
NDVI	85	***	0.77 ^c	0.81 ^b	0.82 ^a	0.82 ^a	0.83 ^a	0.83 ^a	1.08
SAVI	85	***	1.14 ^c	1.20 ^b	1.22 ^a	1.22 ^a	1.23 ^a	1.23 ^a	1.08
GNDVI	134	***	0.70 ^d	0.73 ^c	0.74 ^b	0.74 ^{b,a}	0.75 ^a	0.75 ^a	1.07
GSAVI	134	***	1.04 ^d	1.09 ^c	1.10 ^b	1.11 ^{b,a}	1.11 ^a	1.11 ^a	1.07
GOSAVI	134	***	0.70 ^d	0.73 ^c	0.74 ^b	0.74 ^{b,a}	0.75 ^a	0.75 ^a	1.07
G	9	**	7.88 ^a	7.54 ^b	7.50 ^b	7.42 ^b	7.43 ^b	7.40 ^b	1.06
OSAVI	85	***	0.77 ^c	0.81 ^b	0.82 ^a	0.82 ^a	0.82 ^a	0.82 ^a	1.06
SFR-R	62	***	6.79 ^d	6.93 ^c	7.05 ^b	7.12 ^a	7.12 ^a	7.16 ^a	1.05
NormNIR	124	***	0.77 ^c	0.80 ^b	0.81 ^a	0.81 ^a	0.81 ^a	0.81 ^a	1.05
SFR-G	1	ns	10.91 ^a	10.50 ^a	11.37 ^a	10.90 ^a	10.86 ^a	11.40 ^a	1.04

^a Analysis of variance of the N effect on the optical indices: *, **, and ***: statistical significance at $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, and $P \leq 0.001$, respectively. ns indicates no significance ($P > 0.05$).

^b Multiple-comparison test (Student-Newman-Keuls method at 0.05 level): values (average of the provided index over the two trial years for both cultivars and all sampling dates) followed by the same letter within each line are not significantly different at 0.05 level.

^c Ratio of sensitivity between the index value of 250 N divided by the index value of 0 N if the index value of 250 N is higher than that of 0 N; the reciprocal calculation was made if the index value of 0 N was higher than that of 250 N.

The indices provided by the CropScan (NormR, NDVI, SAVI and OSAVI) showed significant N responses for later measurement dates (Table 10). The GNDVI, GSAVI and GOSAVI indices showed significant N responses on all the sampling dates for Bintje 2012, with less sensitive responses for Charlotte in 2012 and late responses for 2013. For R and G indices, the N effect was not very sensitive. This was also the case for the SFR-G index provided by the Multiplex. Out of a total of 26 sampling dates, a non-significant N effect was observed on 18 dates for SFR-G, 19 dates for G and 13 dates for R.

1.3.4.2. Earliness of the diagnosis

- Effect of N rate on N indices for the first sampling dates

For both trials and cultivars, NBI-R, HNT/FLV, HNT/FLAV, FLV and FLAV indices were able to reveal significant N response on the first measurement dates (19 and 25 DAE in 2012 and 7-8 and 13 DAE in 2013) (Table 10). NBI-G (except for Charlotte in 2013 at 7 DAE) and NBI (except for Charlotte in 2012 at 19 DAE) were also able to reveal significant N responses on early measurement dates. The HNT was able to reveal a significant N effect at an early stage only in the 2013 trial. The NormG, GNDVI, GSAVI, GOSAVI indices showed a significant effect of N fertilisation at early stages for Bintje only in 2012.

Thus flavonoid indices, whether or not combined with chlorophyll, showed a consistent early response to N doses, even at 7-8 DAE (for 2013). The UV-induced chlorophyll fluorescence related to the accumulation of polyphenolic content is described as an early spectral signature to detect nitrogen deficiency compared to detections based on changes in reflectance or transmittance linked only to the reduction of the chlorophyll concentration of leaves (Samson et al. 2000, Cadet, 2008). However, the earliness of diagnosis observed at 7-8 DAE should be considered carefully, because at early emergence plants are dependent on the reserves of the seed tubers and there is normally no sudden N deficiency before 2-3 weeks after emergence.

Table 10. Reading responses of different optical indices (see description in Table 6) to N fertiliser rates for each cultivar and for each sampling date in 2012 and 2013 trials.

		Anova N effect ^a																									
Year	2012												2013														
Cultivar	Bintje						Charlotte						Bintje						Charlotte								
Sampling date	2006	26/06	3/07	10/07	17/07	24/07	19/06	25/06	2/07	9/07	16/07	23/07	14/06	19/06	26/06	4/07	10/07	18/07	24/07	11/07	17/07	24/07	1/07	8/07	15/07	22/07	
DAE	19	25	32	39	46	53	19	25	32	39	46	53	8	13	20	28	34	42	48	7	13	20	27	34	41	48	
Absolute indices	NBI-R	***	**	**	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***		
	NBI-G	**	**	***	***	***	ns	**	***	***	***	***	ns	**	***	***	***	***	***	***	ns	***	***	***	***	**	
	NBI	*	***	***	***	***	***	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***	
	HNT/FLV	***	***	***	***	***	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	
	HNT/FLAV	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	
	RVI	ns	**	***	*	**	***	ns	**	***	*	ns	**	ns	ns	***	***	***	***	***	ns	*	***	***	***	***	
	FLV	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	
	FLAV	***	**	***	***	***	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	
	GRVI	ns	***	***	**	*	***	ns	ns	***	***	ns	**	ns	ns	**	***	***	***	***	***	ns	*	**	***	***	***
	NormR	ns	***	***	*	**	***	ns	**	***	*	**	**	ns	ns	***	***	***	***	***	ns	**	***	***	***	***	

Table 10. to be continued

Year		2012												2013													
Cultivar		Bintje						Charlotte						Bintje						Charlotte							
Sampling date	2006	26/06	3/07	10/07	17/07	24/07	19/06	25/06	2/07	9/07	16/07	23/07	14/06	19/06	26/06	4/07	10/07	18/07	24/07	11/07	17/07	24/07	1/07	8/07	15/07	22/07	
DAE	19	25	32	39	46	53	19	25	32	39	46	53	8	13	20	28	34	42	48	7	13	20	27	34	41	48	
Absolute indices	GDVI	ns	***	***	ns	*	*	ns	***	***	*	ns	ns	ns	*	***	**	***	***	ns	***	***	***	***	***	***	
	DVI	ns	***	***	ns	ns	*	ns	***	***	*	ns	ns	ns	*	***	***	***	**	ns	**	***	***	***	***	***	
	R	ns	**	***	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	*	ns	ns	ns	***	***	*	***	***	ns	ns	***	***	ns	***	***
	CHL	ns	*	***	***	***	***	ns	ns	***	***	***	***	***	**	**	***	***	***	***	ns	**	***	***	***	***	***
	NIR	ns	**	***	ns	ns	*	ns	***	***	*	ns	ns	ns	ns	*	***	**	**	**	ns	*	*	***	***	***	***
	NormG	*	***	***	**	ns	***	ns	ns	***	***	ns	**	ns	ns	*	***	***	***	***	ns	*	*	***	***	***	***
	HNT	ns	***	***	***	***	***	ns	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	ns	***	***	***	***	***
	NDVI	ns	***	***	**	**	***	ns	**	***	**	**	**	ns	ns	**	***	***	***	***	ns	*	***	***	***	***	***
	SAVI	ns	***	***	**	**	***	ns	**	***	***	**	**	ns	ns	**	***	***	***	***	ns	*	***	***	***	***	***
	GNDVI	*	***	***	***	*	***	ns	ns	***	***	ns	**	ns	ns	**	***	**	***	***	ns	*	***	***	***	***	***
	GSAVI	*	***	***	***	*	***	ns	ns	***	***	ns	**	ns	ns	**	**	***	***	***	ns	*	***	***	***	***	***

Table 10. to be continued

Year		2012												2013													
Cultivar		Bintje						Charlotte						Bintje						Charlotte							
Sampling date		20/06	26/06	3/07	10/07	17/07	24/07	19/06	25/06	2/07	9/07	16/07	23/07	14/06	19/06	26/06	4/07	10/07	18/07	24/07	11/07	17/07	24/07	1/07	8/07	15/07	22/07
DAE		19	25	32	39	46	53	19	25	32	39	46	53	8	13	20	28	34	42	48	7	13	20	27	34	41	48
Absolute indices	GOSAVI	*	***	***	***	*	***	ns	ns	***	***	ns	**	ns	ns	**	***	**	***	***	ns	*	***	***	***	***	***
	G	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	**	***
	OSAVI	ns	***	***	**	**	***	ns	**	***	**	**	**	ns	ns	**	***	***	***	***	ns	*	***	***	***	***	***
	SFR-R	**	ns	ns	***	ns	*	**	*	ns	ns	ns	***	*	ns	ns	***	***	***	**	ns	ns	ns	*	***	***	**
	NormNIR	ns	***	***	***	*	***	ns	**	***	***	ns	**	ns	ns	**	***	***	***	***	ns	*	***	***	***	***	***
SFR-G	***	ns	ns	***	ns	ns	***	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	**	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns

^a Analysis of variance of the nitrogen effect (N) per sampling date expressed as Days After Emergence (DAE) including the six levels of N rates (0 N, 50 N, 100 N, 150 N and 200 N and 250 N). *, **, and *** indicate statistical significance at $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, and $P \leq 0.001$ respectively. ns indicates no significance ($P > 0.05$).

The indices obtained in 2014 and related to LFC (FLV, FLAV), whether or not combined with LCC (the case of NBI-R, NBI-G, NBI, HNT/FLV and HNT/FLAV) also match the criteria of sensitivity and earliness of diagnosis (Table 11 and Table 12), confirming the previous results. These indices showed significant N effects across the sampling period (Table 11) and for each sampling date (Table 12). Table 11 supports the previously observed sensitivity of the combined chlorophyll- and flavonoid-based indices according to the RS.

Table 11. Reading responses of flavonoid and/or chlorophyll indices (see description in Table 6) to increasing N fertiliser rates across the sampling period for the 2014 trial and for both potato cultivars (Bintje and Charlotte).

		N effect						
		ANOVA test ^a		Multiple-Comparison test ^b				RS ^c
		F value	Pr	Tested N rates (kg ha ⁻¹)				
				0	100	200	250	
Absolute indices	NBI-R	134	***	0.65 ^d	0.89 ^c	1.08 ^b	1.17 ^a	1.79
	NBI-G	145	***	2.08 ^d	2.75 ^c	3.33 ^b	3.57 ^a	1.72
	NBI	161	***	25.07 ^d	31.58 ^c	35.64 ^b	37.68 ^a	1.50
	HNT/FLAV	153	***	41.78 ^d	51.51 ^c	58.56 ^b	61.49 ^a	1.47
	HNT/FLV	212	***	32.96 ^d	40.34 ^c	45.22 ^b	46.99 ^a	1.43
	FLAV	95	***	1.08 ^a	0.96 ^b	0.87 ^c	0.83 ^d	1.30
	FLV	144	***	1.40 ^a	1.25 ^b	1.14 ^c	1.09 ^d	1.29
	CHL	133	***	33.81 ^c	37.59 ^b	39.24 ^a	39.76 ^a	1.18
	HNT	441	***	43.43 ^c	46.94 ^b	48.84 ^a	48.95 ^a	1.13
	SFR-R	28	***	7.06 ^c	7.31 ^b	7.53 ^a	7.49 ^a	1.06
	SFR-G	24	***	9.90 ^c	10.25 ^b	10.67 ^a	10.54 ^a	1.06

^a Analysis of variance of the N effect on the optical indices for 2014 trial including the four N rates (0 N, 100 N, 200 N and 250 N). ***: statistical significance at $P \leq 0.001$.

^b Multiple-comparison test (Student-Newman-Keuls method at 0.05 level): values (average of the provided index across the 2014 trial for both cultivars and all sampling dates) followed by different letters within each line are significantly different at 0.05 level.

^c Ratio of sensitivity between the index value of 250 N divided by the index value of 0 N if the index value of 250 N is higher than that of 0 N; the reciprocal calculation was made if the index value of 0 N was higher than that of 250 N.

Table 12. Reading responses of flavonoids and/or chlorophyll indices (see description in Table 6) to N fertiliser rates for each cultivar and for each sampling date in the 2014 trial.

		Anova N effect ^a														
Cultivar		Bintje							Charlotte							
Sampling date		11/6	18/6	26/6	3/7	17/7	24/7	31/7	11/6	16/6	26/6	30/6	17/7	24/7	29/7	
DAE		22	29	37	44	58	65	72	25	30	40	44	61	68	73	
Absolute indices	NBI-R	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	
	NBI-G	***	***	***	***	***	***	***	*	**	***	***	***	***	***	
	NBI	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	
	HNT/FLAV	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	
	HNT/FLV	***	***	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***	***	
	FLAV	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***
	FLV	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	*
	CHL	***	***	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***	**	***
	HNT	***	***	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***
	SFR-R	ns	ns	**	***	*	***	*	ns	ns	*	*	**	**	**	***
	SFR-G	ns	ns	ns	***	*	***	*	ns	ns	ns	*	*	*	*	**

^a Analysis of variance of the nitrogen effect (N) on optical indices per date including the four N rates (0 N, 100 N, 200 N and 250 N). DAE: Days After Emergence. *, **, and *** indicate statistical significance at $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, and $P \leq 0.001$ respectively.

1.3.4.3. Accuracy

- Precision

Table 13 shows the Pearson correlation coefficient between the index and the N concentration in shoots or in the whole plant biomass. If r is close to -1, there is a significant negative linear relationship between the optical index and the N content; if r is close to 1, there is a strong positive linear relationship. Except for SFR-G and G, the indices showed very highly significant correlations with both the reference methods (either with plant biomass N content or with shoot biomass N content) across the period of sampling data as a whole.

The negative significant correlations observed for FLV and FLAV, both across the sampling period and per sampling date (Table 13), confirm the opposite dependence of flavonoid-based indices to N status (Table 9). The positive significant correlations observed for CHL, NBI, SFR-R, NBI-G, NBI-R, HNT, HNT/FLV and HNT/FLAV, both across the sampling period and per sampling date (Table 13), confirm the relation of these indices (chlorophyll-based indices and chlorophyll- and flavonoid-based indices) to N status as depicted in Table 9.

Table 13. Precision of the indices evaluated in the 2012 and 2013 trials on the basis of the Pearson correlation coefficient obtained between the index and the N content.

		DAE	NBI-R	NBI-G	NBI	HNT/FLV	HNT/FLAV	RVI	FLV	FLAV	GRVI	NormR	GdVI	DVI	R	CHL	NIR	NormG	HNT	NDVI	SAVI	GNDVI	GSAVI	GOSAVI	G	OSAVI	SFR-R	NormNIR	SFR-G		
Plant biomass N content	Bintje 2012	25	0.71 ^a	0.72	0.87	0.88	0.81	0.65	-0.85	-0.72	0.72	-0.68	0.7	0.66	-0.6	0.47	0.66	-0.69	0.77	0.7	0.7	0.7	0.71	0.71	0.71	-0.41	0.7	-0.12	0.7	-0.13	
			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*	***	ns	***	ns
		32	0.82	0.83	0.87	0.91	0.91	0.84	-0.87	-0.85	0.78	-0.77	0.73	0.75	-0.77	0.72	0.7	-0.75	0.85	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	-0.53	0.77	0.32	0.79	0.17	
			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	ns	***
	39	0.84	0.84	0.9	0.91	0.89	0.6	-0.88	-0.82	0.49	-0.56	0.25	0.18	-0.54	0.91	0.14	-0.42	0.88	0.62	0.61	0.47	0.48	0.48	0.48	-0.23	0.62	0.73	0.7	0.76		
		***	***	***	***	***	**	***	***	*	**	ns	ns	ns	***	ns	*	***	**	**	*	*	*	*	ns	**	***	***	***	***	
	53	0.6	0.41	0.57	0.7	0.5	0.78	-0.54	-0.23	0.85	-0.79	0.59	0.59	-0.1	0.55	0.54	-0.84	0.77	0.79	0.8	0.84	0.84	0.84	0.84	0.06	0.79	0.55	0.84	0.15		
		**	*	**	***	*	***	**	ns	***	***	**	**	ns	**	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	***	**	***	ns	
Charlotte 2012	25	0.74	0.76	0.62	0.63	0.72	0.39	-0.65	-0.72	0.11	-0.39	0.5	0.51	-0.13	-0.06	0.55	-0.07	-0.02	0.4	0.4	0.14	0.15	0.14	0.36	0.4	-0.32	0.27	-0.37			
		***	***	**	***	***	ns	***	***	ns	ns	*	*	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
	32	0.73	0.8	0.85	0.88	0.83	0.85	-0.86	-0.74	0.74	-0.82	0.67	0.7	-0.78	0.8	0.7	-0.7	0.78	0.83	0.83	0.72	0.73	0.72	-0.44	0.83	0.16	0.8	0.03			
		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*	***	ns	***	ns	
39	0.81	0.76	0.82	0.89	0.88	0.68	-0.87	-0.82	0.58	-0.65	0.44	0.41	-0.2	0.72	0.38	-0.55	0.87	0.69	0.69	0.57	0.59	0.58	-0.12	0.69	0.2	0.73	0.17				
	***	***	***	***	***	***	***	***	**	**	*	*	ns	***	ns	**	***	***	***	***	**	**	**	ns	***	ns	***	ns			
53	0.77	0.75	0.72	0.8	0.84	0.15	-0.74	-0.8	0.14	-0.19	0.18	0.11	-0.2	0.64	0.07	-0.11	0.79	0.23	0.23	0.12	0.12	0.12	0.12	-0.07	0.23	-0.05	0.22	0.05			
	***	***	***	***	***	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		

Table 13. to be continued

		DAE	NBI-R	NBI-G	NBI	HNT/FLV	HNT/FLAV	RVI	FLV	FLAV	GRVI	NormR	GDVI	DVI	R	CHL	NIR	NormG	HNT	NDVI	SAVI	GNDVI	GSAVI	GOSAVI	G	OSAVI	SFR-R	NormNIR	SFR-G	
Plant biomass N content	Bintje 2013	13	0.75	0.57	0.64	0.77	0.75	0.19	-0.83	-0.76	0.22	-0.22	0.09	0.13	-0.2	0.18	0.03	-0.23	0.41	0.19	0.19	0.24	0.23	0.23	-0.25	0.19	-0.15	0.23	-	0.22
			***	**	***	***	***	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		20	0.64	0.58	0.56	0.66	0.7	0.54	-0.6	-0.71	0.45	-0.58	0.54	0.55	-0.55	0.43	0.57	-0.35	0.55	0.57	0.57	0.44	0.44	0.44	-0.12	0.57	0.04	0.52	0.08	
			***	**	**	***	***	**	**	***	*	**	**	**	**	*	**	ns	**	**	**	*	*	*	ns	**	ns	**	**	ns
		34	0.85	0.8	0.8	0.87	0.86	0.85	-0.86	-0.86	0.71	-0.82	0.8	0.85	-0.66	0.73	0.78	-0.76	0.85	0.82	0.83	0.62	0.63	0.63	-0.01	0.82	0.68	0.82	0.43	
			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	***	ns	***	***	***	***
		42	0.86	0.78	0.91	0.94	0.91	0.85	-0.93	-0.91	0.72	-0.82	0.82	0.78	-0.55	0.9	0.76	-0.72	0.87	0.83	0.84	0.73	0.74	0.74	-0.29	0.83	0.51	0.8	-0.11	
		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	***	*	***	ns
	Charlotte 2013	13	0.76	0.81	0.73	0.81	0.79	0.44	-0.86	-0.81	0.42	-0.43	0.58	0.56	-0.26	0.33	0.58	-0.42	0.33	0.45	0.45	0.42	0.43	0.42	-0.09	0.45	0.01	0.43	0.29	
			***	***	***	***	***	*	***	***	*	*	**	**	ns	ns	**	*	ns	*	*	*	*	*	*	ns	*	ns	*	ns
		20	0.72	0.65	0.74	0.76	0.75	0.59	-0.74	-0.75	0.46	-0.63	0.54	0.49	-0.69	0.53	0.44	-0.45	0.66	0.65	0.64	0.51	0.51	0.51	-0.25	0.65	-0.2	0.65	-0.39	
			***	***	***	***	***	**	***	***	*	**	**	*	***	**	*	***	***	***	***	*	*	*	*	ns	***	ns	***	ns
	27	0.88	0.81	0.84	0.87	0.87	0.76	-0.89	-0.92	0.78	-0.72	0.83	0.82	-0.53	0.68	0.82	-0.77	0.77	0.72	0.73	0.77	0.77	0.77	0.36	0.72	0.35	0.75	-0.36		
	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	***	ns	***	ns	
	41	0.93	0.9	0.94	0.95	0.94	0.89	-0.96	-0.94	0.93	-0.81	0.84	0.8	-0.8	0.91	0.8	-0.91	0.97	0.82	0.82	0.9	0.9	0.9	-0.7	0.82	0.88	0.88	0.59		
	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*

Table 13. to be continued

	DAE	NBI-R	NBI-G	NBI	HNT/FLV	HNT/FLAV	RVI	FLV	FLAV	GRVI	NormR	GDVI	DVI	R	CHL	NIR	NormG	HNT	NDVI	SAVI	GNDVI	GSAVI	GOSAVI	G	OSAVI	SFR-R	NormNIR	SFR-G
Plant biomass N content	0.86 ^b	0.67	0.82	0.87	0.86	-0.53	-0.83	-0.86	-0.53	0.57	-0.66	-0.66	0.5	0.61	-0.66	0.51	0.54	-0.57	-0.57	-0.54	-0.55	-0.55	0.02	-0.57	0.47	-0.58	-0.09	
	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	***	***	***	ns
Shoot N content	0.85 ^c	0.64	0.82	0.85	0.85	-0.52	-0.82	-0.85	-0.49	0.53	-0.63	-0.64	0.45	0.61	-0.64	0.46	0.53	-0.53	-0.53	-0.5	-0.5	-0.5	-0.02	-0.53	0.47	-0.53	-0.1	
	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	***	***	***	ns

^a Pearson correlation coefficient obtained for each plant sampling date between the index and the plant biomass nitrogen content expressed in g 100 g⁻¹ of dry matter weight (%) (24 data corresponding to six N rates and four replications for each cultivar);

^b Pearson correlation coefficient obtained across the sampling period between the index and the plant biomass nitrogen content (384 data corresponding to six N rates, four replications and 16 dates including the two trial years and the two cultivars);

^c Pearson correlation coefficient obtained across the sampling period between the index and the above-ground biomass nitrogen content expressed in g 100 g⁻¹ of dry matter weight (%) (384 data); *, **, and *** indicate statistical significance correlation at $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, and $P \leq 0.001$ respectively. ns indicates no significance correlation at $P > 0.05$. Grey areas indicate the six best performances per sampling date.

For the R index, the positive correlation with N content obtained across the sampling period and for the cultivar as a whole is contradictory with the observed correlations per sampling date (negative correlations) (Table 13) and with the described N relationship depicted in Table 9 (as N rates increased, R index decreased from 0 to 250 N). Similar contradictory responses were obtained for the other CropsScan indices (NIR index, the normalised indices and the vegetation indices) by comparing the correlations obtained for the sampling period and the cultivar as a whole with those obtained per sampling date (Table 13).

This could be related to different responses of canopy reflectance as the growth stages progress and thus a stableness response of the measurement for different sampling dates. For example, Xue et al. (2004) reported a negative correlation of reflectance at 560 nm with leaf N content for each sampling date, but when the data are considered as a whole it seems that a positive relationship existed before the heading stage in rice.

The correlations obtained with N content when considering the sampling period were higher for NBI-R, NBI, HNT/FLV, HNT/FLAV, FLV and FLAV indices (coefficients greater than 0.8) than for the other studied indices. Considering the correlations obtained for each sampling date, these indices (NBI-R, NBI, HNT/FLV, HNT/FLAV, FLV and FLAV) were ranked in general as the six best-performing in terms of higher Pearson coefficients. For one date (at 53 DAE), the FLAV index showed non-significant correlation with plant biomass N content. NBI-G generally showed high correlations (when considering the sampling period as a whole and per sampling date) and thus achieved, like the flavonoid indices, whether or not combined or not with the chlorophyll indices, high performances for precision. The CHL and HNT indices generally showed a statistically significant correlation with N content per sampling date, but for some early dates (25 DAE for Charlotte in 2012 and 13 DAE in 2013) the correlation was not significant or very small. The precision of the NBI index measured by Dualex and the chlorophyll index measured by SPAD, the other version of HNT chlorophyll-meter, was also assessed by Confalonieri et al. (2015). In this latter study, the NBI demonstrated the highest correlation (per shoots or plant biomass N content) to the chlorophyll-meter, as was also the case in our study.

For CropsScan indices the obtained correlations with N content were not always statistically significant and varied with the growth stage (Table 13); thus the precision of CropsScan measurement is less satisfactory than that achieved by flavonoid indices, whether or combined with chlorophyll indices.

- **Repeatability**

Repeatability was assessed in this study by the coefficient of variation of the indices calculated between the four repetitions (Table 14). Coefficients of variation below 15% indicate good repeatability (Pryseley et al. 2010). With the exception of some Multiplex indices (SFR-G and NBI-G) on the last measurement date in 2012 and some CropsScan indices at 46 DAE, the coefficients of variation indicated an acceptable range of repeatability between repetitions. Confalonieri et al. 2015 found that the chlorophyll index (SPAD index measured by chlorophyll-meter)

demonstrated higher repeatability than the chlorophyll- and flavonoid-based index (NBI). In this latter study, repeatability was calculated as a function of the standard deviation of repeatability (S_r) and was assessed by performing repeated optical measurements under the same conditions by the same operator.

1.3.4.4. Specificity

The specificity of the indices was studied among four factors: N, cultivar, experimental year and measurement date (DAE) (Table 15). Ideally a good index for the evaluation of CNS will be sensitive to N (significant N effect) without being influenced by cultivar, year or DAE (no significant effect).

A significant difference between the two cultivars was observed for most of the absolute indices (Table 15). However, when the relative indices are considered using the well-fertilised reference plot (250 N) or the control reference plot (0 N); the cultivar effect indicated no significant difference. The interactions of N*Cultivar was not significant (except for the absolute NBI index). This is an indication that the N responses of the indices are consistent for both the studied cultivars (Table 15).

A significant influence of experimental year and DAE was observed in general for both the absolute and the relative indices (Table 15). The interaction effects of N*year and N *DAE were significant for almost all the absolute and relative indices indicating that the responses of indices varied with year and sampling dates. Except for NBI-G and NBI, the absolute indices showed higher F values associated with the year or the DAE factor than with the N factor. The relative indices in general (except for the CHL index using the 0N plot) showed an opposite tendency, with higher F values associated with the N factor than with the year or the DAE factor. The F values suggested that the significant year or the DAE effect is predominant for the absolute indices, while the significant N effect is predominant for the relative indices.

The indices provided by optical sensors (absolute indices) therefore showed low specificity to N (significant effects of factors other than N). This low specificity could be alleviated by the use of relative indices (using 0 or 250 N as reference N rates) with predominant significant N effects, smaller year and DAE effects and no significant cultivar effect. This result is in agreement with the need to use normalisation procedures for crop measurements to minimise the influence of factors other than N fertilisation on the performance of the optical readings (Schröder et al. 2000, Samborski et al. 2009, Goffart et al. 2013).

Table 14. Coefficients of variation for the absolute indices obtained between the four repetitions (all nitrogen fertilisation levels).

		Coefficients of variation (%)																											
	DAE	NBI-R	NBI-G	NBI	HNT/FLV	HNT/FLAV	RVI	FLV	FLAV	GRVI	NormR	GDVI	DVI	R	CHL	NIR	NormG	HNT	NDVI	SAVI	GNDVI	GSAVI	GOSAVI	G	OSAVI	SFR-R	NormNIR	SFR-G	
Binije 2012	19	74	79	68	4.1	4.1	85	64	55	27	63	48	69	59	39	45	15	2	47	47	16	16	16	5.1	47	13	17	17	
	25	52	2.6	2.1	43	4.5	8	53	5.5	5	82	32	36	109	39	3	46	14	24	24	22	2.1	2.2	8.1	24	2.8	1.7	44	
	32	33	18	44	2.6	0.9	12	36	17	44	29	24	27	39	35	31	45	0.8	0.6	0.6	12	12	12	72	0.6	0.6	0.7	29	
	39	09	2.1	43	2.1	0.8	75	2.6	0.6	102	73	54	66	48	2.2	64	105	11	09	09	28	28	28	168	09	09	0.8	11	
	46	95	11.7	36	16	2.7	37	21	33	55	44	6	46	81	34	5	49	1	0.5	0.5	14	14	14	34	0.5	2.8	0.4	44	
53	64	35.7	72	3.6	94	31	2.6	8.6	14	3	63	64	67	5	64	14	13	04	04	03	04	04	52	04	31	02	34.5		
Charlotte 2012	19	77	7.6	56	24	3.1	3.6	14	5.5	2	3.5	23	28	2.1	5.5	18	13	24	17	17	11	11	11	18	17	12	0.8	17	
	25	99	8.8	22	2.6	4.6	2	3.6	6.8	58	23	24	19	31	35	2	5	23	04	04	18	18	18	62	04	09	0.7	11	
	32	82	44	88	43	3.7	1	5.1	42	17	1.7	3.7	33	43	42	33	16	11	02	02	04	0.5	0.4	19	02	12	0.2	4	
	39	8.7	6.6	11.5	5.1	48	44	5	4.7	39	4.7	7	72	81	6.8	73	41	02	0.5	0.5	1	1	1	10	0.5	2.7	0.3	61	
	46	3.6	2.7	95	34	19	353	4.1	2.1	271	19	32	83	96	54	73	276	0.7	17	18	92	91	91	379	1.7	12	31	34	
53	82	194	105	76	108	64	66	106	49	6	64	64	43	48	59	44	18	08	08	11	11	11	42	08	24	0.8	219		
Binije 2013	8	26	19	51	19	16	61	3	2.5	27	4.5	09	66	48	26	18	27	14	69	69	25	25	25	4.1	69	12	14	32	
	13	68	102	98	28	5.5	2	04	7	16	16	18	16	41	94	22	09	23	17	17	11	1	11	42	17	31	0.8	67	
	20	29	42	64	25	2.1	79	34	33	73	5.6	47	43	52	34	3	6	15	21	21	29	29	29	52	21	27	18	45	
	28	7	5.6	57	27	4.4	2	2.5	44	29	2.5	2.5	2.1	34	38	2.1	24	09	03	03	08	08	08	2.1	03	04	0.3	08	

Table 14. to be continued

	DAE	NBI-R	NBI-G	NBI	HNT/FLV	HNT/FLAV	RVI	FLV	FLAV	GRVI	NormR	GDVI	DVI	R	CHL	NIR	NormG	HNT	NDVI	SAVI	GNDVI	GSAVI	GOSAVI	G	OSAVI	SFR-R	NormNIR	SFR-G
Binje 2013	34	62	6.7	8.5	24	2.5	3.9	3.2	2.5	3.1	6.6	4.3	3.5	3.4	5.8	3.6	2	1	1	1	14	14	14	2.7	1	2.3	0.5	3.3
	42	64	9.5	5.8	3.1	3.7	2.8	2.4	2.5	3.1	2.2	4.2	4	3	3.8	3.9	2.9	1.1	0.5	0.5	0.8	0.8	0.8	1.5	0.5	2.6	0.5	4.2
	48	6.3	3	7.6	4.3	3	0.8	4.5	2.8	7.6	1.4	4.8	5.3	4.1	3.3	5.2	7.1	1.5	0.1	0.2	2.2	2.1	2.2	11.1	0.1	3.4	0.9	6.6
Charlotte 2013	7	4.7	8.8	9	3.6	3.7	4.2	2.8	1	2.2	3	4.3	4.3	6	6.3	3.1	1.7	3.8	5.6	5.5	2.3	2.3	2.3	2.3	5.5	3.8	1.4	8.3
	13	4.7	2.7	4	2	2.3	4.9	0.6	2.1	2.3	3.2	3.2	4.2	3.3	3.4	2.8	1.2	1.5	2.8	2.8	1.2	1.2	1.2	1.5	2.8	0.8	1.2	2.3
	20	3.4	4	2.3	2.3	3.5	7.4	0.9	1.2	1.3	8.3	3.4	5	4.6	2.9	4.2	11.8	1.9	1.4	1.4	4.7	4.6	4.7	16.4	1.4	1.5	1.6	2.8
	27	2	4.7	4.4	0.5	1.5	3.2	1.5	1.3	1.4	4	2.2	2.7	1.7	4.1	2.3	1.1	1.4	0.6	0.6	0.3	0.3	0.3	1.8	0.6	1.6	0.3	5.3
	34	4.9	10.1	7.2	2	2.4	2	2.3	1.8	0.5	2	1.1	11.1	11.2	7	1.1	0.5	1.8	0.3	0.3	0.1	0.2	0.1	10.7	0.3	5.3	0.1	1.0
	41	4.8	12.7	3.9	1.6	2.1	1.7	0.9	0.9	1.8	3.4	2.6	3.1	2.1	5.6	2.8	2.1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	4.9	0.5	1.3	0.2	8.7
	48	7.8	13.1	7.8	2.8	3.2	5.6	2	0.7	3.1	6.6	4.6	5.6	5.4	5.9	5.2	3.3	1.4	1.4	1.4	0.9	0.8	0.8	7.9	1.4	5.2	0.4	14.1

Coefficient of variation (%) measured as the ratio between the standard deviation and the mean of the indices calculated between the four repetitions per date and combining the six levels of N rates (0 N, 50 N, 100 N, 150 N and 200 N and 250 N).

Table 15. Comparison of the absolute indices versus the relative indices.

Tested Anova factors ^a		NBI-R	NBI-G	NBI	HNT/FLV	HNT/FLAV	FLV	FLAV	CHL	HNT	SFR-R	SFR-G		
Absolute indices ^b	N	Pr	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	
		F value	358.46	204.55	370.02	388.93	511.13	404.43	260.32	181.26	339.39	172.7	0.54	
	Cultivar	Pr	***	**	ns	*	***	ns	**	ns	***	***	ns	
		F value	184.94	97.02	0.06	30.33	363.54	0.03	64.97	0.14	1317.51	598.2	0.44	
	Year	Pr	***	***	ns	***	***	***	**	***	***	***	ns	
		F value	35.17	160.26	2.4	50.25	62.31	60.33	14.13	197.55	1473.09	312.74	3.07	
	DAE	Pr	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	
		F value	373.64	33.49	264.01	451.16	621.35	514.04	165.46	103.97	104.16	170.64	12.46	
	N*Cultivar	Pr	Ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
		F value	1.38	3.01	0.85	0.09	0.26	0.3	0.14	0.95	0.24	2.36	1.23	
	N*Year	Pr	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	
		F value	13.25	3.37	9.78	18.59	14.11	16.56	11.17	11.08	15.17	6.15	0.53	
	N*DAE	Pr	*	ns	***	***	*	***	***	***	***	***	ns	
		F value	2.19	0.78	6.75	8.13	2.1	8.82	4.28	4.4	13.12	5.64	0.43	
	Relative indices (x N/250 N) ^c	N	Pr	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns
			F value	251.43	139.9	338.27	321.91	369.34	307.15	201.79	164.82	346.41	183.52	1.1
Cultivar		Pr	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
		F value	0.35	2.22	0.48	0.03	0.7	1.25	0.27	0.62	0.02	6.32	5.91	
Year		Pr	***	***	***	***	**	**	**	***	**	*	ns	
		F value	33.96	95	29.87	26.71	22.79	24.25	18.9	47.9	16.65	7.42	0.95	
DAE		Pr	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	
		F value	56.64	9.52	52.23	66.2	42.89	39.19	20.63	57.1	59.75	38.68	0.64	
N*Cultivar		Pr	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
		F value	0.01	1.85	0.18	0.02	0.47	0.11	0.19	0.63	0.3	1.82	2.45	
N*Year		Pr	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	
		F value	16.24	5.63	13.73	13.85	15.27	11.16	14.02	16.55	14.01	9.73	1.56	
N*DAE		Pr	***	ns	***	***	***	***	*	***	***	***	ns	
		F value	2.19	0.78	6.75	8.13	2.1	8.82	4.28	4.4	13.12	5.64	0.43	

Table 15. to be continued

Tested Anova factors ^a		NBI-R	NBI-G	NBI	HNT/FLV	HNT/FLAV	FLV	FLAV	CHL	HNT	SFR-R	SFR-G		
Relatives indices (x N/0 N) ^d	N	Pr	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	
		F value	186.6	230.05	452.92	297.83	233.38	1057.14	71.57	81.93	90.32	53.24	0.91	
	Cultivar	Pr	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		F value	4.67	16.21	3.28	0	0.01	4.76	0	1.26	1.76	11.3	2.23	
	Year	Pr	***	***	***	**	***	**	**	**	***	***	***	ns
		F value	34.04	48.21	29.65	26.01	63.54	17.59	13.75	22.82	46.83	32.67	0.31	
	DAE	Pr	***	***	***	***	***	***	ns	***	***	***	***	ns
		F value	36.83	11.09	107.44	28.6	22.47	14.86	3.05	138.05	49.38	14.61	2.29	
	N*Cultivar	Pr	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		F value	0.14	1.67	0.76	0.02	0.49	0.21	0.13	1	0.18	1.05	0.44	
	N*Year	Pr	***	*	***	***	***	**	*	***	*	ns	ns	ns
		F value	9.6	2.89	6.72	5.93	4.74	4.44	3.15	7.43	2.42	1.35	1.03	
	N*DAE	Pr	***	***	***	***	***	**	***	***	***	***	***	ns
		F value	8.08	3.39	9.76	9.24	7.52	5.01	2.74	7.84	5.62	3.95	1.33	

^a Analysis of variance of nitrogen (N) effect, cultivar effect, year effect measurement date effect (expressed in days after emergence, DAE) and their interaction on the optical indices across the 2012, 2013 and 2014 trials and the four N treatments (0 N, 100 N, 200 N and 250 N). For each studied effect the probability (Pr) expressed in *, **, *** and ns (statistical significance at $P \leq 0.05$, statistical significance at $P \leq 0.01$, statistical significance at $P \leq 0.001$ and no significance respectively) and the F statistical value;

^b Absolute indices: mean per plot of the reading provided directly by the optical sensors; ^c Relative indices (x N/250 N): ratio between the mean of the reading for a given N treatment and the mean of the reading for the well-fertilised N treatment (250 N); ^d Relative indices (x N/0 N): ratio between the mean of the reading for a given N treatment and the mean of the reading for the control treatment (0 N).

The specificity of other factors was not tested in this study. However, many factors affecting crop growth could influence chlorophyll and flavonoid indices. Samson et al. (2000) stated that S deficiency does not affect UV-induced fluorescence (related to the accumulation of polyphenolics content) and decreases LCC. Water stress affects LCC (Gianquinto et al. 2004), but different results have been reported concerning LFC. Fortier et al. (2010) found an increase in flavonoid concentration in the absence of irrigation. In this latter study, LFC was sensed by a Dualex device using both leaf sides. However, Cartelat et al. (2005) stated that the total polyphenolic content remained unchanged, while only the polyphenolic content on the abaxial side of wheat leaves changed. This is due to a change in the allocation of polyphenolics between the two sides of the leaves.

According to the studied criteria of sensitivity, earliness of diagnosis and accuracy, the flavonoid indicator (i.e. FLV index) whether or not combined with chlorophyll indices (i.e. the NBI-R, HNT/FLV and HNT/FLAV indices) was able to meet all the requirements successfully. However, the criterion of specificity to N was not achieved for all the studied indices. This low specificity can be improved by the use of relative values.

1.4. Conclusion

Analysis of indices provided from the in-season plant readings shows that indices based on the estimation of LFC (FLV), measured by fluorescence and whether or not combined with LCC (NBI-R, HNT/FLV, HNT/FLAV) are more promising for evaluating the CNS than indices measured by transmittance and reflectance. Despite the fact that absolute indices show low specificity to N (due to cultivar, sampling date and year effects on the optical readings), which can be improved by the use of relative values, the identified promising indices were able to match the required criteria successfully. These indices were sensitive to crop N status. The measurements revealed significant difference among all the tested N rates across the sampling period, showed significant N response on each sampling date and were able to assess highly contrasting N conditions according to the computed ratio of sensitivity. These indices showed an early N diagnosis compared to the indices provided by the chlorophyll-meter or the radiometer. The identified indices accurately estimated the CNS, since they were closely related to shoot and plant biomass N content (good precision) and they indicated an acceptable range of repeatability. The NBI index was also as good predictor for CNS as the equivalent indices identified as promising and based on chlorophyll- and flavonoid-based indicators. However, for a single date the sensitivity criterion was not achieved. The FLAV index (measured by the Multiplex) related to LFC could also be considered a good predictor for CNS with slightly less sensitivity than the FLV index (measured by the Dualex). The FLV and NBI-R indices, measured directly by the fluorimeters, seem more suitable for practical application than HNT/FLV and HNT/FLAV indices, since these combined ratios are derived from measures with two different

sensors (chlorophyll-meter and fluorimeter) which will limit their use. Another important consideration when comparing optical sensors is the crop surface area that is measured. Dualex and Multiplex measured a surface of 19-20 mm² and 50 cm² respectively. In order to take account of field heterogeneity, it is necessary to consider a more representative surface or to compute sufficient replication and adequate sample selection. The expected embedded versions of the fluorimeters positioned further away from the plant will make this possible.

References

- Agati, G., Foschi, L., Grossi, N., Guglielminetti, L., Cerovic, Z., G., and M. Volterrani. 2013. Fluorescence-based versus reflectance proximal sensing of nitrogen content in *Paspalum vaginatum* and *Zoysia matrella* turfgrasses. *European Journal of Agronomy* 45, 39-51. doi.org/10.1016/j.eja.2012.10.011.
- Ben Abdallah, F., Philippe, W., and J.P. Goffart. 2016a. Utilisation de la fluorescence chlorophyllienne pour l'évaluation du statut azoté des cultures (synthèse bibliographique). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 20 (1): 83-93. <http://popups.ulg.be/1780-4507/index.php?id=12627>.
- Ben Abdallah, F., Olivier, M., Goffart, J.P., and O. Minet. 2016b. Establishing the Nitrogen Dilution Curve for Potato Cultivar Bintje in Belgium. *Potato Research* 59:3. 241-258. doi: 10.1007/s11540-016-9331-y.
- Ben Ghazlen, N., Cerovic, Z.G. Germain, C. Toutain, S., and G. Latouche. 2010. Non-destructive optical monitoring of grape maturation by proximal sensing. *Sensor* 10:10040-10068. doi: 10.3390/s101110040.
- Bilger, W., Veit, M., Schreiber, L., and U. Schreiber. 1997. Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. *Physiologia Plantarum* 101: 754-763. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01060.x
- Bongue-Bartelsman, M., and D.A. Phillips. 1995. Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiology Biochemistry* 33: 539-546.
- Buschmann, C. 2007. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Research* 92: 261-271. doi:10.1007/s11120-007-9187-8

- Cadet, É. 2008. Détection et discrimination des carences en N, P et K par la fluorescence induite par UV chez le tournesol nain (*Helianthus annuus*, "Sunspot"). PhD diss., Université du Québec à Trois-Rivières.
- Cartelat, A., Cerovic, Z.G., Goulas, Y., Meyer, S., Lelarge, C., Prioul, J-L., Barbottin, A., Jeuffroy, M-H. Gate, P., Agati, G., et al. 2005. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research* 91: 35-49. doi.org/10.1016/j.fcr.2004.05.002.
- Cerovic, Z.G., Masdoumier, G., Ben Ghazlen, N., and G. Latouche. 2012. A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoid. *Physiologia Plantarum* 146: 251-260. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01639.x.
- Cerovic, Z.G. Cartelat, A., Goulas, Y., and S. Meyer. 2005. In-the-field assessment of wheat-leaf polyphenolics using the new optical leaf-clip Dualex. In: Stafford JV (Ed.) *Precision Agriculture* Wageningen Academic Publishers. Wageningen. 05 pp 243-250.
- Cerovic, Z.G., Ben Ghazlen, N., Milhade, C., Obert, M., Debusson, S., and M. Le Moigne. 2015. Non-destructive diagnostic test for nitrogen nutrition of grapevine (*Vitis vinifera* L.) based on Dualex leaf-clip measurements in the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:3669-3680 doi: 10.1021/acs.jafc.5b00304.
- Confalonieri, R., Paleari, L., Movedi, E., Pagani, V., Orlando, F., Foi, M., et al. 2015. Improving in vivo plant nitrogen content estimates from digital images: trueness and precision of a new approach as compared to other methods and commercial devices. *Biosystems Engineering*, 135, 21-30. doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2015.04.013.
- Daughtry, C. S. T., Walthall, C. L., Kim, M. S., De Colstoun, E. B., and J. E. McMurtrey. 2000. Estimating corn leaf chlorophyll concentration from leaf and canopy reflectance. *Remote Sensing of Environment* . 74(2): 229-239. doi: 10.1016/S0034-4257(00)00113-9.
- Fortier, E., Desjardins, Y., Tremblay, N., Bélec, C., and M. Côté. 2010. Influence of irrigation and nitrogen fertilization on broccoli polyphenolics concentration. *Acta Horticulturae*, 856: 55–62. doi: 10.17660/ActaHortic.2010.856.6.

- Froidmont, E., Mayeres, P., Picron, P., Turlot, A., Planchon, V., and D. Stilmant. 2013. Association between age at first calving, year and season of first calving and milk production in Holstein cows. *Animal*, 7(04), 665-672. doi:10.1017/S1751731112001577.
- Gianquinto, G., Goffart, J.P., Olivier, M., Guarda, G., Colauzzi, M., Dalla Costa, L., Delle Vedove, G., Vos, J., and D.K.L.MacKerron. 2004. The use of hand-held chlorophyll meters as a tool to assess the nitrogen status and to guide nitrogen fertilization of potato crop. *Potato Research* 47:35–80. doi: 10.1007/BF02731970.
- Gitelson, A.A., and M.N. Merzlyak. 1998. Remote sensing of chlorophyll concentration in higher plant leaves. *Advances in Space Research* 22(5): 689-692. doi.org/10.1016/S0273-1177(97)01133-2.
- Goffart, J.P., Olivier, M., and M. Frankinet. 2008. Potato Crop Nitrogen Status Assessment to Improve N Fertilization Management and Efficiency: Past–Present–Future. *Potato Research* 51: 355-383. doi: 10.1007/s11540-008-9118-x.
- Goffart, J.P., Van Den Wyngaert, L., Buffet, D., Leonard, A., and P. Defourny. 2010. SPOT 5 multispectral data potentialities to monitor potato crop nitrogen status at specified field scale. Abstract paper presented at 10th International Conference on Precision Agriculture. Denver. Colorado. USA. July 18-21. 2010.
- Goffart, J.P., Abras, M., and F. Ben Abdallah. 2013. Gestion de la fertilisation azotée des cultures de plein champ. Perspectives d'amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'azote sur base du suivi du statut azoté de la biomasse aérienne. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 17(1) : 221-230. <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=9703>.
- Goulas, Y., Cerovic, Z.G., Cartelat, A., and I. Moya. 2004. Dualex: A new instrument for field measurements of epidermal UV-absorbance by chlorophyll fluorescence. *Applied Optics* 43: 4488-4496. doi: 10.1364/AO.43.004488.
- Guiot, J., Goffart, J.P., and J.P. Destain. 1993. Le dosage des nitrates dans le sol. *Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux*. 27 (1).61-74.

- Lewis, R.J. and S.L. Love. 1994. Potato genotypes differ in petiole nitrate-nitrogen concentrations overtime. *HortScience* 29:175-179.
- Long, C. M., Snapp, S. S., Douches, D. S., and R. W. Chase. 2004. Tuber yield, storability, and quality of Michigan cultivars in response to nitrogen management and seedpiece spacing. *American Journal of Potato Research* 81(5): 347-357. doi: 10.1007/BF02870181.
- Meyer, S., Cerovic, Z. G., Goulas, Y., Montpied, P., Demotes-Mainard, S., Bidel, L. P. R. et al. 2006. Relationships between optically assessed polyphenols and chlorophyll contents, and leaf mass per area ratio in woody plants: a signature of the carbon–nitrogen balance within leaves? *Plant, Cell and Environment* 29(7): 1338-1348. doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01514.x.
- Peng, S., Garcia, F.V., Llaza, R.C. and K.G. Cassman. 1993. Adjustment for specific leaf weight improves chlorophyll meter's estimate of rice leaf nitrogen concentration. *Agronomy Journal* 85: 987–990. doi:10.2134/agronj1993.00021962008500050005x.
- Pryseley, A., Mintiens, K., Knapen, K., Van der Stede, Y., and G. Molenberghs. 2010. Estimating precision, repeatability, and reproducibility from Gaussian and non-Gaussian data: a mixed models approach. *Journal of Applied Statistics* 37(10): 1729-1747. doi: 10.1080/02664760903150706.
- Samborski, S. M., Tremblay, N., and E. Fallon. 2009. Strategies to make use of plant sensors-based diagnostic information for nitrogen recommendations. *Agronomy Journal* 101(4): 800-816. doi: 10.2134/agronj2008.0162Rx.
- Samson, G., Tremblay, N., Dudelzak, A. E., Babichenko, S. M., Dextraze, L., and J.Wollring. 2000. Nutrient stress of corn plants: early detection and discrimination using a compact multiwavelength fluorescent lidar. In *Proceedings of the 20th EARSeL Symposium, Dresden, Germany* (pp. 214-223).
- Shenk, J., and M. Westerhaus. 1993. Monograph: Analysis of agriculture and food products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Infracsoft International. Port Matilda. PA-USA. 103p.
- Schröder, J.J. Neeteson, J.J., Oenema, O., and P.C. Struik. 2000. Does the crop or the soil indicate how to save nitrogen in maize production? Reviewing the

- state of the art. *Field Crops Research* 66: 151-164. doi: 10.1016/S0378-4290(00)00072-1.
- Stewart, A.J., Chapman, W., Jenkins, G.I., Graham, I., Martin, T., and A. Crozier. 2001. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant, Cell and Environment* 24(11):1189–1197. doi: 10.1046/j.1365-3040.2001.00768.x.
- Tremblay, N., Bélec, C., Jenni, S., Fortier, E., and R. Mellgren. 2009. The Dualex – a New Tool to Determine Nitrogen Sufficiency in Broccoli. *Acta Horticulturae* 824: 121-131. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.824.13.
- Tremblay, N., Wang, Z., and C. Belec. 2007. Evaluation of the Dualex for the assessment of corn nitrogen status. *Journal of Plant Nutrition* 30: 1355–1369. doi.org/10.1080/01904160701555689.
- Tremblay, N., Wang, Z., and Z. G. Cerovic. 2012. Sensing crop nitrogen status with fluorescence indicators. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32(2): 451-464. doi: 10.1007/s13593-011-0041-1.
- Vos, J., and M. Bom. 1993. Hand-held chlorophyll meter: a promising tool to assess the nitrogen status of potato foliage. *Potato Research* 36 (4): 301-308. doi: 10.1007/BF02361796.
- Westermann, D. T., and G. E. Kleinkopf. 1985. Nitrogen requirements of potatoes. *Agronomy Journal* 77(4): 616-621.
- Westermann, D. T., Tindall, T. A., James, D. W., and R. L. Hurst. 1994. Nitrogen and potassium fertilization of potatoes: yield and specific gravity. *American Journal of Potato Research* 71(7): 417-431. doi: 10.1007/BF02849097.
- Xue, L., Cao, W., Luo, W., Dai, T., and Y. Zhu, 2004. Monitoring leaf nitrogen status in rice with canopy spectral reflectance. *Agronomy Journal* 96(1): 135-142. doi:10.2134/agronj2004.1350.
- Zhang, Y., Tremblay, N., and J. Zhu. 2012. A First Comparison of Multiplex® for the Assessment of Corn Nitrogen Status. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 10(1):1008-1016.

1.5. Annexe 1

Relation des indicateurs flavonoïdes avec l'indice de nutrition azotée

Comme déjà indiqués précédemment, les indicateurs potentiels du statut azoté de la culture doivent être validés avec les mesures de référence du statut azoté de la culture. Dans l'article précédent, afin de vérifier la justesse des mesures optiques, les indicateurs sont confrontés aux exportations d'azote (aussi bien avec la teneur en azote de la biomasse aérienne qu'avec la teneur en azote de la plante) mesurées par les méthodes analytiques (Tableau 13). Le Tableau 16 considère les corrélations établies pour la variété Bintje entre les indices intéressants, retenus dans l'article précédent, et l'INN qui est l'indicateur de référence du statut azoté de la culture calculé sur base de la courbe de dilution critique de l'azote. À titre comparatif, les corrélations établies entre les indices pertinents et les exportations d'azote sont également reprises au niveau du Tableau 16.

Il en ressort que l'indicateur flavonoïdes (indice FLV) et l'INN sont hautement corrélés (coefficient de corrélation de -0.70). Le coefficient négatif obtenu traduit la relation inverse de l'augmentation de la teneur en flavonoïdes des feuilles avec la diminution de l'INN correspondant à l'augmentation de la déficience en azote. Les indicateurs flavonoïdes couplés à la chlorophylle présentent également de bonnes corrélations avec l'INN (cas des indices NBI-R, HNT/FLAV et HNT/FLV). Les corrélations établies sur base de la teneur en azote (de la plante entière ou de la biomasse aérienne), sont améliorées comparativement aux corrélations établies sur base de l'INN. Sur base de ces corrélations, les indicateurs flavonoïdes seuls ou combinés aux indicateurs chlorophylle sont démontrés comme des mesures justes.

Tableau 16. Corrélation entre les indices optiques et les mesures de référence du statut azoté de la culture.

		Coefficients de corrélation de Pearson					
		INN ^a		teneur en azote de la plante entière ^b		teneur en azote de la biomasse aérienne ^c	
Indices optiques	FLV	-0.70	***	-0.75	***	-0.86	***
	NBI-R	0.57	***	0.63	***	0.83	***
	HNT/FLAV	0.74	***	0.79	***	0.87	***
	HNT/FLV	0.63	***	0.69	***	0.81	***

Coefficients de corrélation de Pearson établis pour la variété Bintje entre 20 et 53 jours après émergence sur les deux années d'expérimentation (2012 et 2013). Corrélations avec les indices optiques sont établies sur base de ^a l'indice de nutrition azotée INN (160 observations), de ^b la teneur en azote de la plante entière exprimée en g .100 g⁻¹ de matière sèche (%) (168 observations), et de ^c la teneur en azote de la biomasse aérienne exprimée en g .100 g⁻¹ de matière sèche (%) (168 observations), *** indique que les coefficients de corrélations sont significatifs au seuil P ≤ 0.001.

Réponse des indicateurs flavonoïdes à des doses d'engrais azoté minéral appliqué

En complément du Tableau 10, les Figures 18, 19, 20 et 21 montrent la sensibilité de réponse des indicateurs pertinents qui sont retenus à l'issue de l'article du chapitre 4. Les évolutions des indicateurs flavonoïdes (Figure 18), seuls ou combinés à la teneur en chlorophylle (Figures 19, 20 et 21), sont présentées en fonction des niveaux d'azote testés pour chaque variété et année d'expérimentation.

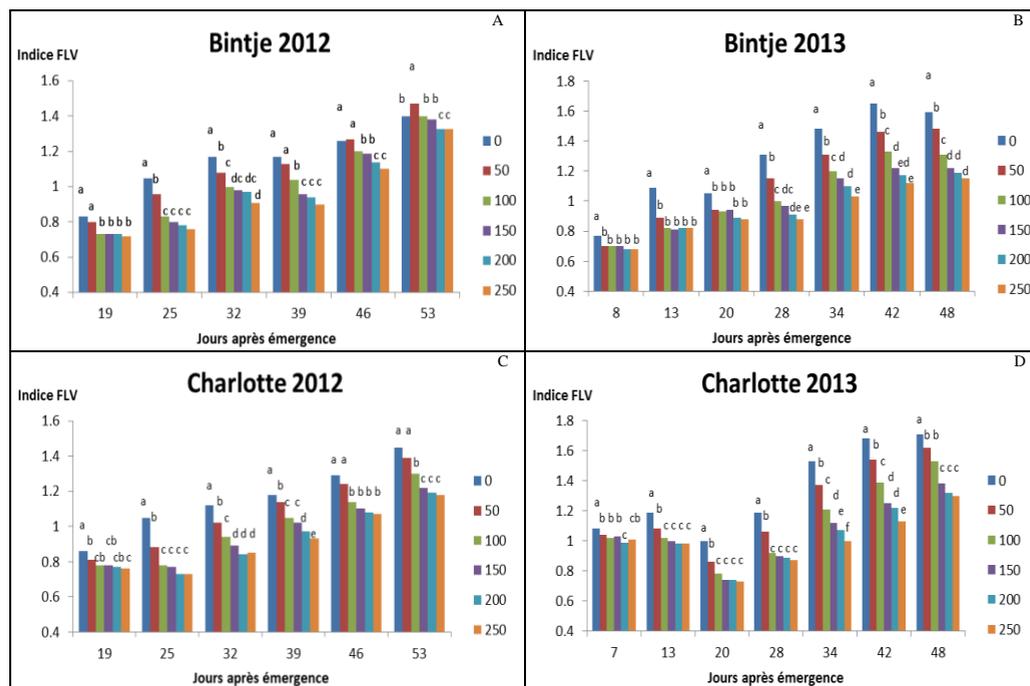


Figure 18. Évolution des indicateurs flavonoïdes (FLV) mesurés par le Dualex en fonction des jours après émergence de la culture pour des niveaux croissants d'azote appliqué -Variété Bintje en 2012 (A) et 2013 (B) et variété Charlotte en 2012 (C) et 2013(D).

Pour chaque période exprimée en jours après émergence, les niveaux d'azote possédant la même lettre ne sont pas significativement différents au niveau 0,05 (méthode Student-Newman-Keuls).

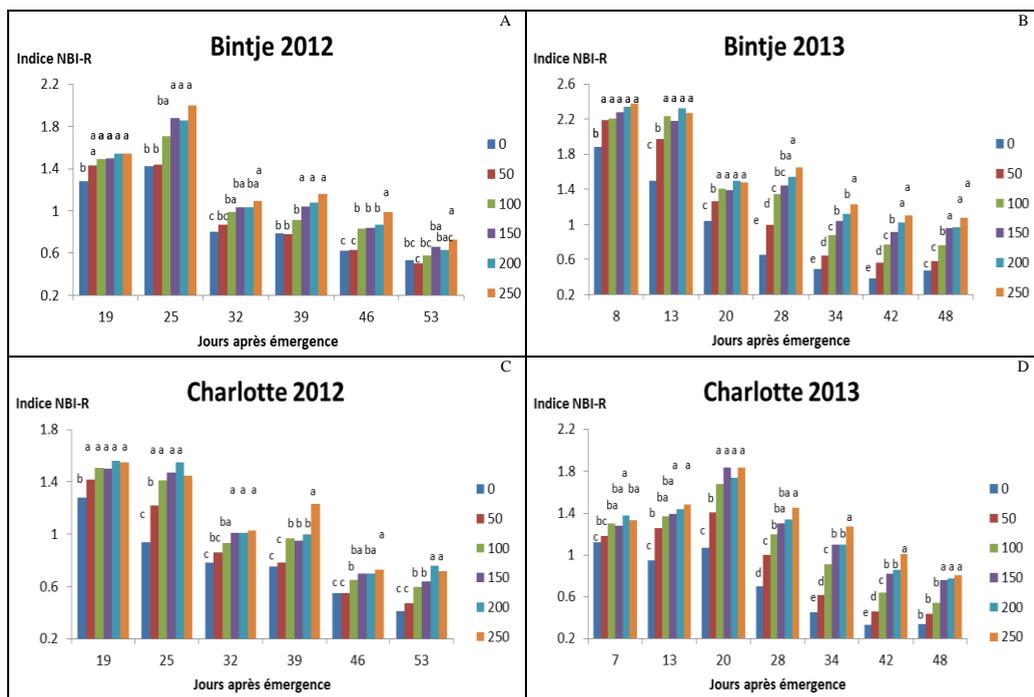


Figure 19. Évolution des indicateurs combinant flavonoïdes et chlorophylle (NBI-R) mesurés par le Multiplex en fonction des jours après émergence de la culture pour des niveaux croissants d’azote appliqué -Variété Bintje en 2012 (A) et 2013 (B) et variété Charlotte en 2012 (C) et 2013(D).

Pour chaque période exprimée en jours après émergence, les niveaux d’azote possédant la même lettre ne sont pas significativement différents au niveau 0,05 (méthode Student-Newman-Keuls).

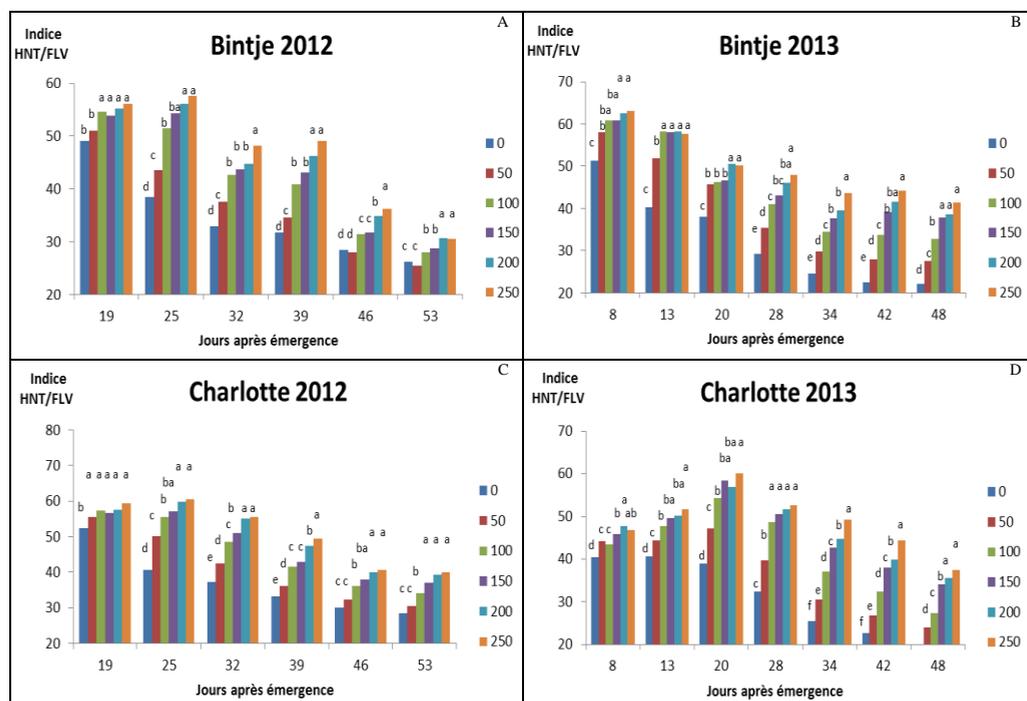


Figure 20. Évolution des indicateurs flavonoïdes (mesurés par le Dualex) combinés à la chlorophylle (mesurée par le chlorophyllomètre Hydro N-tester) en fonction des jours après émergence de la culture pour des niveaux croissants d'azote appliqué -Variété Bintje en 2012 (A) et 2013 (B) et variété Charlotte en 2012 (C) et 2013(D).

Pour chaque période exprimée en jours après émergence, les niveaux d'azote possédant la même lettre ne sont pas significativement différents au niveau 0,05 (méthode Student-Newman-Keuls).

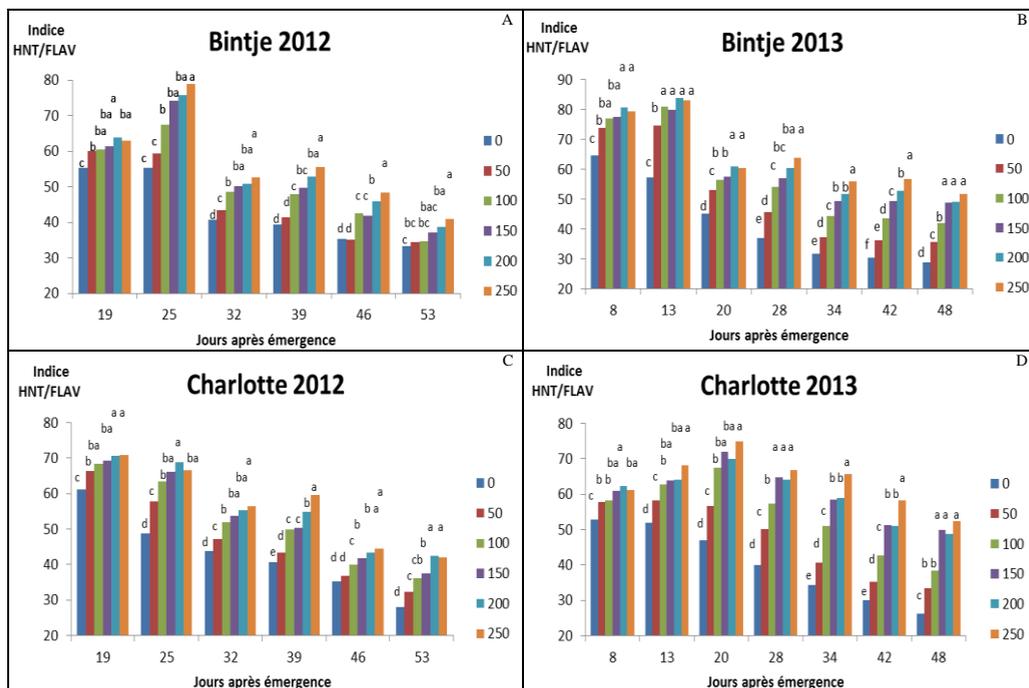


Figure 21. Évolution des indicateurs flavonoïdes (mesurés par le Multiplex) combinés à la chlorophylle (mesurée par le chlorophyllomètre Hydro N-tester) en fonction des jours après émergence de la culture pour des niveaux croissants d'azote appliqué -Variété Bintje en 2012 (A) et 2013 (B) et variété Charlotte en 2012 (C) et 2013(D).

Pour chaque période exprimée en jours après émergence, les niveaux d'azote possédant la même lettre ne sont pas significativement différents au niveau 0,05 (méthode Student-Newman-Keuls).

2. Lien avec le chapitre suivant

Le chapitre 4 étudie les potentialités des indicateurs du statut azoté de la culture de pomme de terre basés sur l'estimation de la teneur en flavonoïdes des feuilles et mesurés par ChlF.

Les potentialités des indicateurs ont été évaluées, durant trois années, par comparaison des mesures optiques sur le feuillage en cours de saison pour deux variétés de pommes de terre (Bintje et Charlotte) cultivées avec des doses croissantes d'azote. En considérant les critères investigués, il apparaît que les mesures de ChlF sont les plus pertinentes pour l'évaluation du statut azoté de la culture comparativement aux mesures de transmittance ou de réflectance. Ces mesures de ChlF intéressantes sont basées sur l'estimation de la teneur en flavonoïdes des feuilles de manière générale et, en particulier, en combinaison à la teneur en chlorophylle des feuilles.

En effet, les indicateurs flavonoïdes (seuls ou combinés à la teneur en chlorophylle) acquis par les fluorimètres Dualex et Multiplex permettent la détection précoce de la déficience en azote mesurée entre 7 et 25 JAE. La détection de la déficience en azote apparaît généralement plus tardivement en prenant en compte les indicateurs chlorophylle mesurés par réflectance (cas du radiomètre Cropscan) à l'échelle de la canopée. Ce défaut de réponse peut être lié au principe de mesure du Cropscan qui présente en début de la phase végétative de la culture, un signal mixte de réflectance lié à la canopée et au sol. Avec le développement progressif de la végétation et la fermeture des rangs de la culture de pomme de terre, cette réponse à l'azote devient plus sensible. La détection de la déficience en azote liée à l'accumulation des composés phénoliques précède également la diminution de la concentration en chlorophylle des feuilles mesurée par transmittance par le chlorophyllomètre Hydro-N tester.

Les mesures de ChlF sont décrites dans notre chapitre comme des mesures justes présentant de bonnes corrélations aussi bien avec les indicateurs du statut azoté de la culture (les INN) que les exportations d'azote (la teneur en azote de la biomasse aérienne et la teneur en azote de la plante) tout au long de la saison de culture. Les mesures réalisées avec le chlorophyllomètre Hydro-N tester présentent également de bonnes corrélations avec les exportations d'azote, mais qui sont généralement observées plus tard en cours de cycle (entre 34 et 53 JAE).

Les mesures de fluorescence présentent une plage de répétabilité adéquate entre les répétitions testées avec des coefficients de variation compris entre 0.4 et 10 %.

En matière de précocité de détection et d'exactitude des mesures (justesse et répétabilité), les indicateurs flavonoïdes couplés aux indicateurs chlorophylle présentent des qualités comparables aux indicateurs flavonoïdes seuls. Cependant, la combinaison des deux indicateurs -chlorophylle et flavonoïdes- améliore la sensibilité des mesures couplées par rapport à l'approche qui considère les mesures uniques de chlorophylle ou de flavonoïdes.

En raison de la faible spécificité de la chlorophylle et des flavonoïdes pour l'évaluation du statut azoté, il s'est avéré utile de travailler avec des valeurs relatives des indices par la prise en compte d'une fenêtre de référence (soit une fenêtre sans apport d'azote, soit une fenêtre surfertilisée) plutôt qu'avec des valeurs absolues de ces indices.

Les indicateurs flavonoïdes mesurés, par les méthodes optiques, au niveau des feuilles de pomme de terre augmentent avec la déficience en azote. Cette tendance traduit l'accumulation des composés phénoliques des feuilles en réponse à la diminution des apports en azote. Ce lien nécessite d'être confirmé sans équivoque et sera étudié au chapitre 5 par des méthodes quantitatives et qualitatives permettant le dosage et l'identification des composés phénoliques au niveau des feuilles des deux variétés de pommes de terre considérées au niveau de ce travail de thèse et recevant des niveaux de fumures croissantes.

Chapitre 5

**Les composés phénoliques en relation avec
la concentration en azote des feuilles**

Chapitre 5. Les composés phénoliques en relation avec la concentration en azote des feuilles

Le chapitre 5 a pour but d'investiguer la relation entre « accumulation des composés phénoliques foliaires et diminution des apports en azote » pour deux variétés de pommes de terre cultivées en plein champ.

Le quatrième article encore à soumettre [*Ben Abdallah F., Goffart JP. & Romnée JM . Effects of nitrogen fertilization on the accumulation of phenolic compounds on potato leaves*], traite de la question de recherche 3 qui porte sur la caractérisation et l'identification de la présence spécifique de classes de composés phénoliques et leur estimation quantitative au niveau des feuilles des deux variétés de pommes de terre en réponse à une déficience en azote.

Au niveau de ce chapitre, les mesures analytiques des composés phénoliques sont également comparées aux mesures optiques de la ChlF afin de vérifier si l'estimation de la concentration quantitative des composés phénoliques (en particulier des flavonols) est possible à partir des mesures indirectes.

1. Effects of nitrogen fertilization on the accumulation of phenolic compounds on potato leaves

Ben Abdallah F., Goffart J.P. & Romnée J.M.

Abstract. Several studies proved the presence of an inverse relationship between flavonoids content and nitrogen (N) levels in the leaves of different species. The objectives of this study were 1) to confirm that N deficiency leads to the accumulation of phenolics content in potato leaves; 2) to identify the class of phenolic (the type of UV absorbing) compound present in potato leaves in relation to N stress and 3) to determine if the optical non destructive chlorophyll fluorescence (ChlF) method can be used to determine the UV absorbing flavonoids compounds in potato leaves related to N status. Optical ChlF and analytical measurements (Dumas for leaf N content, Folin-Ciocalteu for total leaf phenolics and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography for some specific phenolic compounds) were performed on potato leaves collected from two years' field experiments including two cultivars and three increasing N rates. The optical flavonoid measurements assessed by ChlF showed inverse relationship of leaf flavonoids content and N availability. The contrasting N fertilization rates did not show a conclusive effect on the total phenolics content of potato leaves and on the individual phenolic contents as well. The integrative DR₃₇₅ nm parameter related to leaf flavonols content was able to reveal a significant N effect for both cultivars confirming that N deficiency leads to the accumulation of phenolics content. The total flavonols content measured for Bintje as the sum of rutin, quercetin and kaempferol-3-rutinoside content showed also an inverse relationship with N content. However, due to a cultivar differential phenolic accumulation related to N status, the used standards for the identification of phenolic compounds were not representative of the leaf flavonols content for Charlotte. According to the higher correlation coefficients calculated between DR₃₇₅ nm and optical flavonoids indices, we can conclude that the ChlF method can be used to determine the UV absorbing compounds in potato leaves related to N status.

Keywords. phenolic compounds, potato leaves, nitrogen.

1.1. Introduction

Phenolic compounds are secondary plant metabolites. They arise biogenetically from two main synthetic pathways: the shikimate pathway and the acetate pathway (Bravo, 1998). They can range from simple molecules such as phenolic acids, to highly polymerized compounds such as tanins. The flavonoids are a large class of phenolic compounds which include chalcones, aurones, flavonones, isoflavonoids, flavones (e.g., apigenin, luteolin, diosmetin), flavonols (e.g., quercetin, myricetin, kaempferol), leucoanthocyanidins, catechins, and anthocyanins (Bravo, 1998; Croteau et al., 2000). The common structure of flavonoids is that of

diphenylpropanes (C6-C3-C6) which include two aromatic rings (ring A and B) joined with a three carbons (the C ring) that usually form an oxygenated heterocycle (Bravo, 1998). Flavonoids exist generally as glycoside derivatives in plants and occasionally as aglycones (Bravo, 1998).

A wide range of functions have been proposed to flavonoids in relation to biotic and abiotic stresses (Di Ferdinando et al., 2012) including pathogen attack (Dixon and Paiva, 1995; Henriquez et al., 2012), high solar irradiance (Agati et al., 2009), cold stress (Christie et al., 1994) and nutrient stress (Chishaki and Horiguchi, 1997; Stewart et al., 2001; Juszczuk et al., 2004).

Nitrogen (N) deficiency leads to the accumulation of flavonoids concentration in different plants and organs. Several studies proved the presence of an inverse relationship between flavonoids content and nitrogen levels in the leaves of different species. Flavonols (quercetin, kaempferol and isorhamnetin) accumulation in the leaves of mature tomato plants was found to increase significantly in response to N stress (Stewart et al., 2001). Løvdaal et al. (2010) found an increase of the expression of structural genes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways in response to N depletion, in agreement with a corresponding increase in flavonoid (anthocyanins and flavonols) and caffeoyl content in tomato leaves. Except the rutin, the concentration of flavonols decreased in potato leaves with additional N supply (Mittelstraß et al., 2006). Lea et al. (2007) showed that N deficiency resulted in the accumulation of anthocyanins and flavonols in Arabidopsis and enhanced transcript levels of certain genes important for the accumulation of these compounds.

The mechanism behind the response of polyphenols to N deficiency is still controversial (Becker et al., 2015). Different hypotheses, such as the carbon-nutrient balance hypothesis and the growth-differentiation balance hypothesis, have been considered in order to explain the influence of nutrient deficiency on secondary phenolic metabolism (Caretto et al., 2015). These hypotheses state that carbon skeletons synthesized by photosynthesis are used for growth (involving primary metabolites) or defence (involving secondary metabolites) (Caretto et al., 2015). Under stress, for example N stress which inhibits growth more than photosynthesis, the extra carbon skeletons is allocated to the accumulation of carbon based secondary compounds (Estiarte et al., 1994; Caretto et al., 2015).

The deamination of phenylalanine (precursor of flavonoids and phenolics synthesis) could also explain the accumulation of flavonoids in limiting N conditions. Under N depletion, the expression of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) increases inducing the release of ammonia from phenylalanine and enhancing the level of available N in the plant (Olsen et al., 2009). High PAL expression is often found in parallel with high levels of flavonoids (Lillo et al., 2008) and then products of the deamination reaction are shunted into the flavonoids pathways (Margna, 1997 in Solecka, 1997).

The photoprotection role of flavonoids due in part to their UV screening properties could explain the accumulation of flavonoids in limiting N conditions. Nitrogen deficiency disturbs photosynthesis. A malfunctioning photosystem can explain the increasing concentrations of flavonoids to prevent the photosynthetic machinery (Stewart et al., 2001). More generally, since various environmental stresses lead to

excessive production of reactive oxygen species causing progressive oxidative damage (Sharma et al., 2012), it has been postulated that flavonoids are synthesized to effectively counter the stress-induced oxidative damage (Di Ferdinando et al., 2012) by preventing the generation and reducing the reactive oxygen species (Agati and Tattini 2010).

Winkel-Shirley (2002) suggested the flavonoid synthesis, transport and allocation as hallmarks of an adaptive metabolism, to exert protective, antibiotic and modulatory effects. Work on *Arabidopsis thaliana* revealed that flavonoids pathway was important for better tolerance to N starvation (Peng et al., 2008)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and gas chromatography, or their combinations, with mass spectrometry are the two most commonly applied methods to quantify phenolic compounds (Khoddami et al., 2013). These destructive techniques require samples preparation and extraction.

The comparison of the absorbance spectra represent a good tool for the identification of the phenolic class present in leaves (Cerovic et al. 2002). The UV absorbing function of the epidermis, which is responsible for most of the UV absorption of the leaf (Cartelat et al., 2005), is mainly fulfilled by hydroxycinnamic acids and flavonoids (Cerovic et al., 2002). Hydroxycinnamic acids absorb predominantly in the UV-B (280–315 nm) and flavonoids absorbance peaks are often located in the UV-A range (315–400 nm) (Kolb et al., 2001; Cerovic et al., 2002).

Non destructive methods using chlorophyll fluorescence (ChlF), case of the Dualex device (Force-A, Orsay, France), have been developed to evaluate leaf phenolic compounds content on the basis of the UV-absorbing properties of epidermis (Cartelat et al., 2005). This approach is based on the comparison of the ChlF excitation ratio measured under two excitation wavelengths, far red fluorescence under red excitation and far red fluorescence under UV excitation. The UV excitation is absorbed by phenolic compounds, and the red reference excitation crosses the epidermis without being absorbed before reaching the chlorophyll in the mesophyll. Ounis et al. (2001) showed that the logarithm of the fluorescence excitation ratio is a quantitative measure of epidermal absorbance. The UV absorbing properties of the epidermis in situ is of particular importance for the determination of the content of phenolic compounds since the influence of specific leaf structure on UV absorption and the local distribution of these compounds in leaves are lost by the extraction procedures (Cerovic et al., 2002).

The Dualex enables the estimation of flavonoids in general and more particularly flavones in monocots and flavonols in dicots which are the major epidermal phenolic absorbers at 375 nm (the used wavelength in the Dualex) (Cerovic et al. 2002).

Although plants commonly respond to low N concentration with the accumulation of phenolic compounds, there have been a few contrasting reports (Becker et al., 2015). For example, in chamomile plants, flavonols decreased while flavones strongly increased in response to N deficiency (Kováčik & Klejdus, 2014). In buckwheat, Christensen et al. (2010) reported no significant effect of the

concentration of flavonoids with N application. Nitrogen fertilization increases the content of anthocyanin in potato tubers (Michalska et al., 2016). In our Knowledge, two reports (Mittelstraß et al., 2006, Jin et al. 2014) studied the effect of N application on phenolic compounds in potato leaves. These studies were conducted under controlled environment. Moreover the contrasting reports require confirming that low N concentrations lead to the accumulation of phenolic compound in potato leaves under field conditions where ambient light have an important impact on these compounds.

The objectives of this study were 1) to confirm that N deficiency leads to the accumulation of phenolics content in potato leaves; 2) to identify the class of phenolic (the type of UV absorbing) compound present in potato leaves in relation to N stress and 3) to determine if the optical non destructive ChlF method can be used to determine the UV absorbing flavonoids compounds in potato leaves related to N status.

1.2. Material and methods

1.2.1. Study sites

This study was part of the potato experiment conducted at the experimental site of the Walloon Agriculture Research Center in Gembloux, Belgium in 2012 and 2013. The experiments included two potato [*Solanum tuberosum* (L.)] cultivars, Charlotte and Bintje (early and mid-early cultivars respectively) and increasing N fertiliser rates for each cultivar (see Ben Abdallah et al. 2018 for more details). A split plot design (the cultivar as the main-plot factor and N treatment as the subplot factor) with four replications was used in this study.

1.2.2. Leaf sampling

Samples of leaflets from mature leaves (20 samples for 2012 and 30 samples for 2013) were collected for both cultivars at three measurement dates for 3 replications (Table 17). The collected samples concerned the control treatment (0 kg N/ha), the moderate treatment (100 kg N/ha) and the highest N treatment (250 kg N/ha). The measurement dates are expressed in day after emergence (DAE) of the crop.

Table 17. Sampling dates for optical and analytical measurements.

2012		2013	
Bintje	Charlotte	Bintje	Charlotte
22/06/2012 (21)	22/06/2012 (22)	21/06/2013 (15)	21/06/2013 (17)
06/07/2012 (35)	06/07/2012 (36)	03/07/2013 (27)	03/07/2013 (29)
25/07/2012 (54)	25/07/2012 (55)	17/07/2013 (41)	17/07/2013 (43)

Numbers in parentheses indicate the day after emergence (DAE) of the crop

1.2.3. Optical flavonoid measurements

After sampling, epidermal flavonoids were optically estimated in the laboratory using a portable leaf-clip device, the Dualex. The instrument determines the epidermal absorbance in the UV-A, mainly due to flavonoids (more precisely to flavonols subclass), by comparing the ChlF signals at two different excitation wavelengths (375 for UV and 650 nm for red) (Cartelat et al. 2005). Adaxial and abaxial flavonoids indices (FLV_adaxial and FLV_abaxial respectively) were measured directly by the optical device from the middle part of the leaf avoiding the main veins. The estimated flavonoids content (FLV_total) of single leaves was calculated as the sum of the adaxial and abaxial values.

1.2.4. Analytical methods

Sample preparation

After optical measurements, the samples were stored in a freeze. The frozen material were lyophilized and placed under vacuum until analysis. The leaves were then crushed in fine powder prior to the chemical analysis. Each sample represents 20 or 30 leaflet collected from one plot (respectively for 2012 and 2013) and then average across the 3 replications for the same N level.

Total leaf nitrogen determination

The total leaf N status for each crushed sample average across the 3 replications (300 mg to 500 mg) was determined based on the Dumas method using the TruMac® CN analyzer (LECO France, Paris, France) and the results are expressed in % of dry weight (DW).

Quantitative determination of total phenolic content

Crushed product for each sample (500 mg) was extracted with 2 ml of methanol and the total phenolic compounds (TPC) were determined using Folin-Ciocalteu with slight modifications (Slinkard & Singleton, 1977). The gallic acid was used as a standard compound. TPC of samples was measured at 725 nm and expressed as Gallic Acid Equivalents (GAE) in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW. The calibration equation for gallic acid was $Y = 0.0103 X + 0.0086$ ($R^2 = 0.999$) where Y is the absorbance and X is the concentration of gallic acid. All samples were analyzed in duplicates. The TPC of samples were average across the duplicates.

Quantitative and qualitative determination of phenolic compounds

The analysis of the phenolic compounds was carried out using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography system (UHPLC, Acquity H-Class Bio UPLC®, Waters SA, Zellik, Belgium), coupled to a diode array detector (DAD, Acquity UPLC® DA eλ Detector, Waters SA, Zellik, Belgium) from 200 nm to 500 nm. The method of standard addition was used as previous results have shown a compound-dependent analysis (non-published results).

Some phenolic compounds studied in the literature in relation of N fertilization were identified and purchased. The following compounds were purchased from

Sigma: cryptochlorogenic acid, neochlorogenic acid, coumaric acid, rutin and quercetin. The kaempferol-3-rutinoside was purchased from Extrasynthèse SAS, Genay, France.

One gram of the crushed dried sample was extracted with 10 ml of methanol. The phenolic compounds were separated on a C18 Column (Acquity C18 BEH 1.7 μm , 2.1 mm X 100 mm, Waters SA, Zellik, Belgium) using a mobile phase composed of a mixture of water and methanol (Table 18).

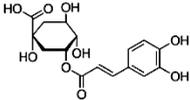
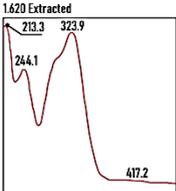
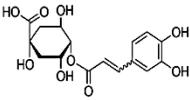
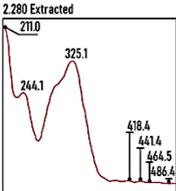
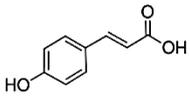
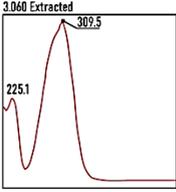
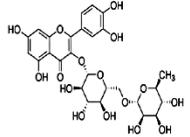
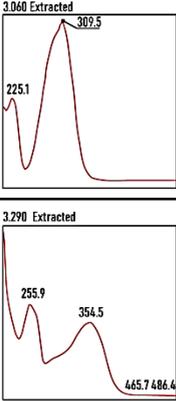
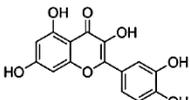
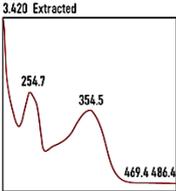
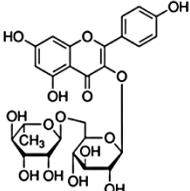
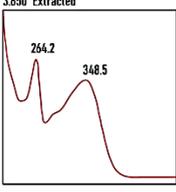
Table 18. The gradient profile of the mobile phase.

	Flow	Solvent A (%) – Water	Solvent B (%) – MeOH
T = 0	400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	95	5
T = 15 minutes	400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	5	95
T = 15.30 minutes	400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	95	5
T = 16.30 minutes	400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	95	5

Data were analyzed using the Empower III software (Waters SA, Zellik, Belgium). Phenolic compounds were identified based on the retention time and their UV spectrum, obtained with the injection of the standards (Table 19). The concentration of individual phenolic compounds was calculated from the measured surfaces on chromatograms extracted at a specific wavelength for each compound. The concentration of total flavonols was calculated as the sum of rutin, quercetin and kaempferol-3-rutinoside.

As absorptions at 370 nm (Shmidt et al., 2010; Tipkanon et al., 2011) and 375 nm (which is the used wavelength of the Dualex device) (Cerovic et al., 2002) was used for quantifying flavonols, the intensity of the detector's response was measured at 375 nm as DR_375 nm (in a.u.). This parameter was calculated as the sum of peak heights extracted from standardized chromatogram at 375 nm. A similar approach was used by Lefebvre et al. (2016) which considered the sum of peak areas integrated at 354 nm (using liquid chromatography) to estimate total flavonoids content. Considering that the DR_375 nm is a reasonable approximation of leaf flavonols content, this parameter was calculated in order to assess the N effect on the accumulation of leaves flavonols and to evaluate the performance of the optical ChlF measurement to estimate the flavonols fraction as a whole.

Table 19. Characteristics of the purchased phenolic compounds and their chromatographic parameters (retention time and UV spectra) determined by UHPLC-DAD.

Compound	Formula	Retention time (min)	UV spectra (200 – 500 nm)	Analytical λ (nm)
Neochlorogenic acid		1.62		323.9
Cryptochlorogenic acid		2.28		325.1
Coumaric acid		3.06		309.5
Rutin (quercetin-3-rutinoside)		3.29		354.5
Quercetin		3.42		354.5
Kaempferol-3-rutinoside		3.65		348.5

1.2.5. Data analysis

The statistical analysis was performed with the SAS software package (SAS 9.4). The studied indices were subjected to analysis of variance (ANOVA, proc glm) in order to study the effect of N on both optical flavonoid measurements (FLV_adaxial, FLV_abaxial and FLV_total) and analytical measurements (measured by Dumas for leaf N content, by Folin cicoleteau for TPC and by UHPLC-DAD for some specific phenolic compounds, total flavonols and DR_375 nm). The analytical measurements were studied for each year (including both cultivar and samplings dates as a whole). The optical flavonoid measurements were studied for each sampling date and for each cultivar. The Pearson correlation coefficients between leaf N content and leaf phenolic compounds were investigated using SAS in order to assess the relationship with N status. The relationship between optical and analytical flavonoids measurements was also investigated in order to confirm the precision of the ChlF measurements.

1.3. Results and discussion

1.3.1. Effect of nitrogen rates on analytical measurements

Effect of nitrogen rates on total leaf nitrogen content

The leaf N content measured for the two experimental years (including both cultivars and sampling dates) increased statistically from the control treatment to the highest N treatment (Figure 22). The difference between the control treatment (0 kg N/ha), the moderate level of N (100 kg N/ha) and the highest N treatment (250 kg N/ha) confirmed that the applied N rates in this study lead to different leaf nitrogen contents.

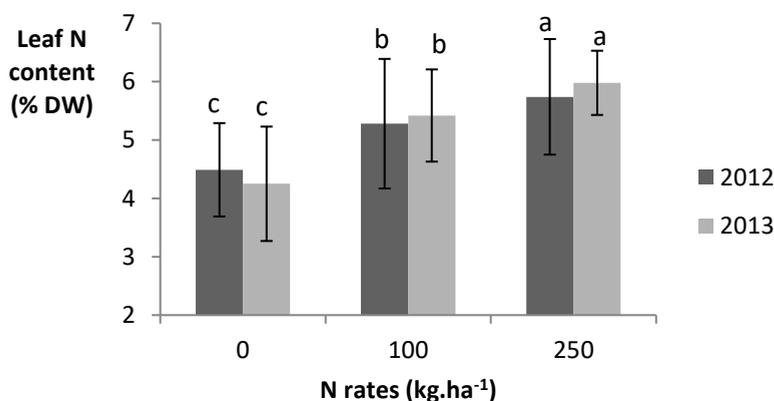


Figure 22. Mean values of leaf N content (% of Dry Weight) average for each year over cultivars and sampling dates and measured based on the Dumas method as a function of nitrogen rates. For each year, values with different letters are significantly different at 0.05 level. The vertical bars represent the standard deviations.

Effect of nitrogen rates on total leaf phenolic content measured using Folin-Ciocalteu method

In contrast to 2012 trial, the TPC in potato leaves measured in 2013 revealed significant decrease from the 0 kg N/ha treatment to the 250 kg N/ha treatment (Figure 23). As pointed out by Stefanelli et al. (2010), increasing N fertilizer rates causes a decrease in the leaf content of phenolic compounds in most cases. This is in accordance with the accumulation of leaf phenolic compounds with N deficiency described for peppers (Estiarte et al., 1994), tomato (Bongue-Bartelsman and Phillips, 1995) and potato (Jin et al., 2014).

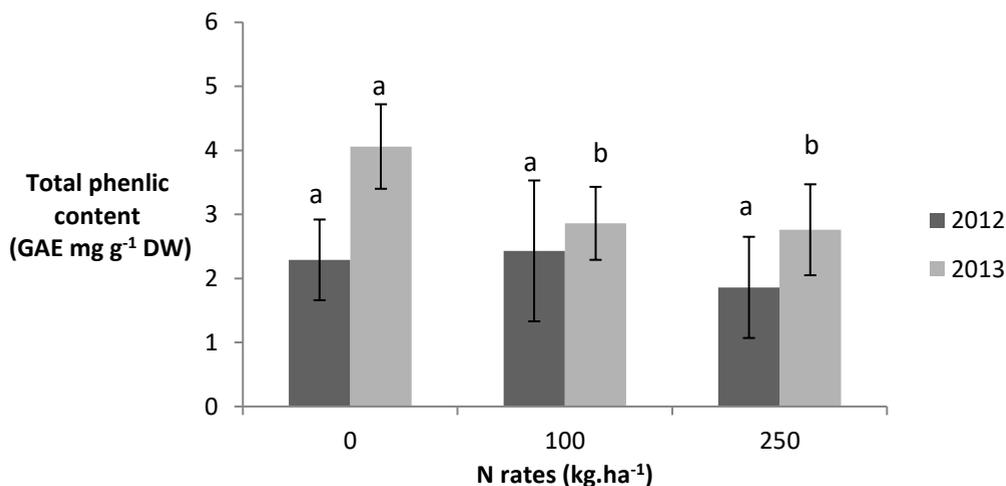


Figure 23. Mean values of leaf total phenolics content (average for each year over cultivars and sampling dates) measured using Folin-Ciocalteu method. Within each experimental year, nitrogen treatments with the same letter are not significantly different at 0.05 level. The vertical bars represent the standard deviations.

Effect of nitrogen rates on leaf phenolic compounds content measured by liquid chromatography (UHPLC)

Within the flavonoids class (more precisely the subclass of flavonols), rutin was the most abundant compound compared to quercetin and kaempferol-3-rutinoside (Table 20). Taking into account phenolic acids, cryptochlorogenic acid was the most abundant compound found in potato leaves particularly for 2012 trial.

Lewis (1996) identified in leaves of potato cultivars quercetin-glycoside 2a, quercetin-glycoside 2b and rutin, as the major flavonols and chlorogenic acid as the major phenolic acid.

Surprisingly, taking into account the concentrations of individual phenolic compounds or total flavonols, no significant effect of N rates were detected for both experimental years (Table 20). Although not statistically significant, total flavonols (calculated as the sum of rutin, quercetin and kaempferol-3-rutinoside) increased from the highest to the lowest N rate. Similar findings in aerial parts of tartary and

normal buckwheat, revealed no significant effect on the concentration of flavonoids between low and high levels of N. Nitrogen fertilization rates did not show a conclusive effect on the concentration of phenolic acids as well (Christensen et al., 2010).

Table 20. Effect of nitrogen rates on leaf phenolic content measured by UHPLC method for each experimental year.

Year	2012			2013		
	N rates (kg ha ⁻¹)	0	100	250	0	100
Neochlorogenic acid	0.62 ^a	0.65 ^a	0.3 ^a	0.25 ^a	1.46 ^a	0.93 ^a
Cryptochlorogenic acid	2.2 ^a	2.72 ^a	2.88 ^a	0.97 ^a	1.91 ^a	0.23 ^a
Coumaric acid	0.04 ^a	0.64 ^a	0.02 ^a	0.07 ^a	0.02 ^a	0.02 ^a
Rutin	0.49 ^a	0.37 ^a	0.33 ^a	0.35 ^a	0.31 ^a	0.36 ^a
Quercetin	0.11 ^a	0.11 ^a	0.08 ^a	0.28 ^a	0.05 ^a	0.07 ^a
Kaempferol-3-rutinoside	0.11 ^a	0.09 ^a	0.08 ^a	0.16 ^a	0.07 ^a	0.11 ^a
Total flavonols	0.71 ^a	0.51 ^a	0.49 ^a	0.79 ^a	0.43 ^a	0.48 ^a
DR_375nm	102.61 ^a	67.06 ^b	36.28 ^c	164.71 ^a	73.23 ^b	45.03 ^b

Analytical phenolics measurements (in mg.g⁻¹ of DW, using UHPLC) average over sampling dates and cultivars for each experimental year, total flavonols (calculated as the sum of rutin, quercetin and kaempferol-3-rutinoside) and DR_375nm calculated as the sum of peak heights extracted from standardized chromatogram at 375 nm. Within each experimental year, nitrogen treatments with the same letter are not significantly different at 0.05 level (Student-Newman-Keuls method).

Mittelstraß et al. (2006) reported a significant decrease of the concentration of chlorogenic acids and most flavonols in potato leaves with additional N supply. Only the flavonols rutin was not affected by N application (Mittelstraß et al., 2006). A higher accumulation of total phenolic and flavonoid compounds determined in potato leaves was also observed for the lowest N rate compared to the other tested N rates (Jin et al., 2014). These results were reported for controlled environments in contrast to the changing environment field conditions conducted in this study. As stated by Sytar et al. (2018), the cultivation of plant in green house vs. field conditions produces different reaction in term of phenolic accumulation. The comparison of the effects of UV radiation and temperature in indoor vs. outdoor conditions indicated that the level of UV radiation plays a dominant role in the accumulation of some phenolic compounds such as flavonoids; while temperature predominantly influences the accumulation of other compounds (phenolic acids) (Sytar et al. 2018). Thus the absence of statistical difference of leaf phenolic content to N fertilization could reflect different trends of the accumulation of the measured phenolic compounds in response of environmental confounding factors.

The reason of the absence of statistical significant difference of leaf phenolics content to N fertilization observed in our study (Table 20) could also be related to the high variance between sampling dates. Since the used samples for analytical phenolic measurements were average per experimental year for both cultivars for the 3 replications of the same N variants, it was not possible to test the statistical difference among N rates for each sampling dates and cultivar.

Another explanation is that we focused in this study on some major phenolic compounds reported in the literature in relation to N fertilization, but it may be possible that the contribution of other phenolic compounds is important regarding their responses to N limitation. In our study, we limited the identification to three compounds in the class of flavonols (rutin, quercetin and kaempferol-3-rutinoside) and to three compounds in the class of phenolic acids (neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and coumaric acid) and as pointed by Lewis (1996) besides the major identified flavonols other compounds such as the flavan-3-ols (catechine, epicatechine), or quercetin-3-galactoside or quercetin-3-glucoside were found in potato leaves. The used standards in our study may not be representative for the estimation of the content of total flavonols as great diversity of flavonoids due to different hydroxylation and glycosylation positions was reported. Since different isomers of flavonols exist, depending on the glycosylation site, the sequence, and the interglycosidic linkages of the glycan portion, it's difficult to identify structurally similar compounds by the used UHPLC method.

Among the UHPLC measurements, only the DR₃₇₅ nm (related to leaf flavonols content) was able to reveal a significant N effect between the three studied N rates on 2012 and between the two contrasting N rates on 2013 (Table 20). As N rates decreased, the DR₃₇₅ nm increased. This general tendency was also observed for each sampling date (Figure 24).

The accumulation of the compounds absorbing at 375 nm appears at early stages of the growth cycle; at 22/06 for 2012 (corresponding to 21 and 22 DAE respectively for Bintje and Charlotte) and 21/06 for 2013 (corresponding to 15 and 17 DAE respectively for Bintje and Charlotte) (Figure 24). As growth progress, a huge increase of the DR₃₇₅ nm was recorded (Figure 24).

1.3.2. Effect of nitrogen rates on optical flavonoids measurements

The flavonoid index measured by the Dualex at the adaxial side (FLV_{adaxial}) showed higher values than the flavonoid index measured at the abaxial side (FLV_{abaxial}). A larger proportion of flavonoids was found in the adaxial epidermis than the abaxial epidermis (Cerovic et al., 2002, Agati et al., 2009). The adaxial side versus abaxial side measured by the chlorophyll fluorescence screening method was shown as sufficient to identify the UV absorbing compounds of the leaves (Cerovic et al., 2002; Cartelat et al., 2005).

In general the optical flavonoids indices decreased from the 250 kg N/ha treatment to the 0 kg N/ha treatment (Table 21). The observed tendency was in general statistically significant between the two contrasting N rates. For some sampling dates, the optical flavonoids indices enabled to distinguish between the three tested N rates (Table 21). Including both cultivars and sampling dates, optical flavonoids

indices were able to reveal significant N effect among the three tested N rates (except FLV_abaxial in 2012) (Annex 2). This inverse relationship of leaf flavonoids content and nitrogen availability is in accordance with previous reported results (Cartelat et al., 2005; Agati et al., 2013, Ben Abdallah et al., 2018).

The optical flavonoids indices (except FLV_abaxial and FLV_total for Bintje at 21/06/2013) were able to detect N deficiency at early growth stages (at 21 and 22 DAE respectively for Bintje and Charlotte in 2012 and at 15 and 17 DAE respectively for Bintje and Charlotte in 2013). This early response to N doses is also confirmed by the DR_375 nm relating the accumulation of flavonols content at early stages. The earliness of response of flavonoids confirmed the previous results of Ben Abdallah et al. (2018) describing the UV-induced ChlF (related to the accumulation of phenolics content) as an early spectral signature to detect nitrogen deficiency compared to detections based on changes in reflectance or transmittance.

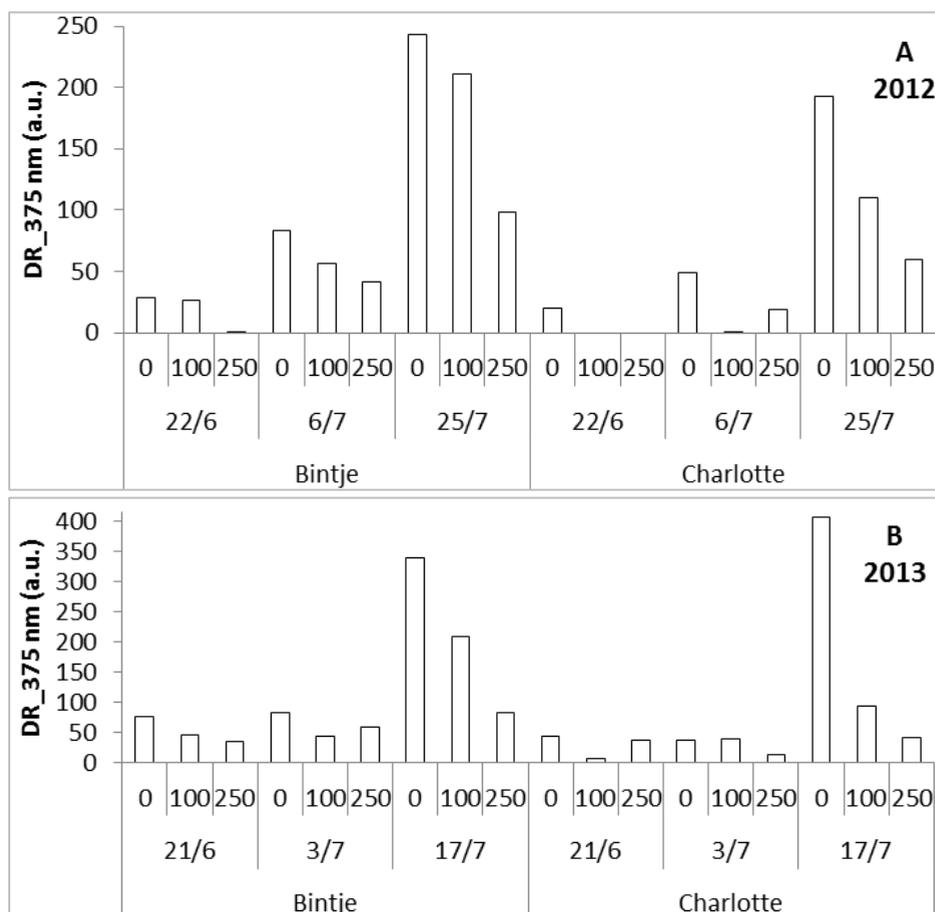


Figure 24. Response of the DR_375 nm measured by UHPLC-DAD on nitrogen rates studied per date and per cultivar for 2012 (A) and 2013 (B) trials.

Table 21. The effect of N fertiliser rates on optical flavonoids indices measured by the Dualex (Force-A, Orsay, France).

Cultivar	Dates	N rates	FLV_abaxial	FLV_adaxial	FLV_total	
Bintje	22/06/2012	0	0.3 ^a	0.95 ^a	1.25 ^a	
		100	0.18 ^b	0.77 ^b	0.95 ^b	
		250	0.16 ^b	0.69 ^c	0.86 ^b	
	6/07/2012	0	0.46 ^a	1.14 ^a	1.58 ^a	
		100	0.37 ^b	0.96 ^b	1.34 ^b	
		250	0.3 ^c	0.87 ^b	1.16 ^c	
	25/07/2012	0	0.58 ^a	1.47 ^a	2.06 ^a	
		100	0.55 ^a	1.36 ^a	1.9 ^a	
		250	0.44 ^a	1.14 ^a	1.58 ^a	
	21/06/2013	0	0.31 ^a	0.87 ^a	1.17 ^a	
		100	0.21 ^a	0.66 ^b	0.88 ^a	
		250	0.21 ^a	0.64 ^b	0.85 ^a	
	3/07/2013	0	0.51 ^a	1.23 ^a	1.74 ^a	
		100	0.36 ^b	1.01 ^b	1.38 ^b	
		250	0.3 ^b	0.9 ^c	1.22 ^c	
	17/07/2013	0	0.76 ^a	1.59 ^a	2.35 ^a	
		100	0.61 ^a	1.28 ^b	1.87 ^b	
		250	0.5 ^a	1.08 ^c	1.58 ^c	
	Charlotte	22/06/2012	0	0.4 ^a	1.04 ^a	1.44 ^a
			100	0.25 ^b	0.78 ^b	1.03 ^b
			250	0.24 ^b	0.71 ^c	0.95 ^c
6/07/2012		0	0.49 ^a	1.17 ^a	1.66 ^a	
		100	0.4 ^{a,b}	0.98 ^{a,b}	1.38 ^{a,b}	
		250	0.31 ^b	0.85 ^b	1.15 ^b	
25/07/2012		0	0.58 ^a	1.41 ^a	1.99 ^a	
		100	0.54 ^a	1.25 ^{a,b}	1.79 ^{a,b}	
		250	0.46 ^a	1.11 ^b	1.58 ^b	
21/06/2013		0	0.43 ^a	1.07 ^a	1.5 ^a	
		100	0.28 ^b	0.75 ^b	1.03 ^b	
		250	0.27 ^b	0.72 ^b	1 ^b	
3/07/2013		0	0.53 ^a	1.17 ^a	1.69 ^a	
		100	0.34 ^b	0.92 ^b	1.26 ^b	
		250	0.29 ^c	0.77 ^c	1.08 ^c	
17/07/2013		0	0.73 ^a	1.7 ^a	2.45 ^a	
		100	0.6 ^b	1.28 ^b	1.88 ^b	
		250	0.49 ^b	1.11 ^c	1.6 ^c	

Optical flavonoids indices: FLV_adaxial: leaf adaxial measurements, FLV_abaxial: leaf abaxial measurements and FLV_total: sum of FLV_adaxial and FLV_abaxial within each year and cultivar, N treatments with the same letter are not significantly different at 0.05 level (Student-Newman-Keuls method).

1.3.3. Relation between leaf N content and leaf phenolic compounds

The responses of leaf phenolic compounds (measured by analytical or optical methods) to leaf N content are presented in Table 22. Among the analytical parameters, significant relationships with leaf N content were obtained only for DR_375 nm, TPC (for Charlotte) and total flavonols (for Bintje) (Table 22). The negative coefficients of these relationships confirmed the general observed trends of increasing leaf phenolic compounds with the decrease of N content (Figure 17, Table 21). As shown by the statistical good correlations (coefficient equal to - 0.74) obtained for each cultivars among the two experimental years, the leaf N content was better explained by DR_375 nm than the other analytical parameters (Table 22).

The negative significant correlations obtained between optical flavonoids parameters and leaf N content (across sampling dates and for both cultivars as a whole) confirm the reported opposite dependence of flavonoid based indices to N status (Table 22) supporting thus the precision of the used device to evaluate the crop N status. Ben Abdallah et al. (2018) showed very highly significant correlations between the FLV_adaxial with both plant biomass N content and shoot biomass N content. Based on the leaf N content, higher correlations were obtained with FLV_total and FLV_adaxial than with FLV_abaxial. The leaf N content is better correlated to FLV_adaxial than FLV_abaxial. The highly correlated coefficient of FLV_adaxial with leaf N content supported that the optical measurements of ChlF of only one side of the leaves (adaxial side) enabled an accurate estimation of the leaf N status.

Table 22. Pearson correlation coefficients obtained between leaf N content and both analytical and optical parameters of leaf phenolics compounds for potato cultivar Bintje and Charlotte across the two experimental years.

Used method	Parameters	Leaf N content					
		Bintje			Charlotte		
Folin-Ciocalteu	TPC	-0.13 ^a	ns ^b	18 ^c	-0.48	*	18
	Neochlorogenic acid	-0.1	ns	18	0.2	ns	17
	Cryptochlorogenic acid	0.22	ns	18	0.29	ns	18
	Coumaric acid	-0.35	ns	18	0.23	ns	18
	Rutin	-0.34	ns	17	0.05	ns	17
UHPLC	Quercetin	-0.44	ns	18	-0.05	ns	18
	Kaempferol-3-rutinoside	-0.25	ns	18	0.06	ns	18
	Total flavonols	-0.56	*	18	-0.03	ns	18
	TPC_UHPLC	0.03	ns	18	0.39	ns	18
	DR_375nm	-0.74	***	18	-0.74	***	18
	FLV_abaxial	-0.8	***	18	-0.91	***	18
Dualex	FLV_adaxial	-0.9	***	18	-0.92	***	18
	FLV_total	-0.87	***	18	-0.92	***	18

^a Pearson correlation coefficient obtained for each cultivar across the two experimental years ;

^b *, ***, indicate statistical significance correlation at $P \leq 0.05$, and $P \leq 0.001$ respectively and ns indicates no significance correlation at $P > 0.05$;

^c number of used data;

Leaf N content expressed in % of Dry Weight measured by Dumas method; TPC: total phenolic content expressed in mg GAE .g⁻¹ of DW; neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, coumaric acid, rutin, quercetin and kaempferol-3-rutinoside are phenolic compounds expressed in mg.g⁻¹ of DW; total flavonols calculated as the sum of rutin, quercetin and kaempferol-3-rutinoside; DR_375nm measured as the intensity of the detector's response from standardized chromatogram at 375 nm; optical flavonoids indices: FLV_adaxial: adaxial measurements, FLV_abaxial: abaxial measurements and FLV_total: sum of FLV_adaxial and FLV_abaxial.

1.3.4. Relation between optical and analytical flavonoid measurements

Table 23 showed that the quercetin for Bintje was better correlated to optical flavonoid measurements than the other individual phenolic contents. The Kaempferol-3-rutinoside was also statistically correlated with FLV_abaxial for Bintje. Taking into account the total flavonols quantified for Bintje, the relationships with optical flavonoid measurements were quite higher than those obtained with the quercetin flavonols subclass alone. Considering the correlations with optical flavonoid measurements (Table 23) and those obtained with leaf N content (Table 22), the total flavonols measured for Bintje as the sum of rutin, quercetin and kaempferol-3-rutinoside content is related to flavonoids compound measured by the Dualex and to leaf N status.

Table 23. Pearson correlation coefficients obtained between optical and analytical flavonoids measurements.

		FLV_abaxial			FLV_adaxial			FLV_total		
Bintje	Rutin	0.29 ^a	ns ^b	17 ^c	0.34	ns	17	0.33	ns	17
	Quercetin	0.59	**	18	0.55	*	18	0.57	*	18
	Kaempferol-3-rutinoside	0.49	*	18	0.4	ns	18	0.44	ns	18
	Total flavonols	0.67	**	18	0.66	**	18	0.67	**	18
	DR_375nm	0.9	***	18	0.89	***	18	0.9	***	18
Charlotte	Rutin	0.03	ns	17	0	ns	17	0.02	ns	17
	Quercetin	0.23	ns	18	0.24	ns	18	0.24	ns	18
	Kaempferol-3-rutinoside	0.15	ns	18	0.16	ns	18	0.16	ns	18
	Total flavonols	0.13	ns	18	0.12	ns	18	0.13	ns	18
	DR_375nm	0.78	***	18	0.85	***	18	0.83	***	18

^a Pearson correlation coefficient obtained for each cultivar across the two experimental years;

^b *, **, and *** indicate statistical significance correlation at $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, and $P \leq 0.001$ respectively. ns indicates no significance correlation at $P > 0.05$.

^c number of used data ; optical flavonoids indices measured by the Dualex: FLV_adaxial: adaxial measurements, FLV_abaxial: abaxial measurements and FLV_total: sum of FLV_adaxial and FLV_abaxial; analytical flavonoids measurements using UHPLC liquid chromatography: rutin, quercetin, kaempferol-3-rutinoside, total flavonoids (calculated as the sum of rutin, quercetin and kaempferol-3-rutinoside) and DR_375 nm calculated as the sum of peak heights extracted from standardized chromatogram at 375 nm.

In contrast, the individual leaf compounds and the total flavonols measured for Charlotte were not correlated with optical flavonoid measurements (Table 23). These different responses of cultivars could reflect differential flavonoid accumulation in potato leaves under N deficiency. This is supported by the absence of correlation between total flavonols and leaf N content obtained for Charlotte Vs. the moderate correlation ($r=0.56$) obtained for Bintje (Table 22).

Good correlations were obtained between optical flavonoid measurements and the DR_375 nm (Table 23). As stated earlier, the DR_375 nm provides a mix of signals representing all the absorbing compounds at 375 nm, mainly flavonol compounds which are the major epidermal phenolic absorbers estimated by the Dualex fluorimeter.

As the DR_375 nm measured for both cultivars reflects better the optical flavonoids parameters (Table 23) and leaf N status (Table 22) than the quantified individual or total flavonols, we could confirm the assumption stating that some leaf flavonols measured by the Dualex and in relation with the crop N status were not identified in this study by the standards used for the UHPLC analysis. This was

especially the case for the cultivar Charlotte for which poor correlations were obtained between total flavonols and both leaf N content (Table 22) and optical flavonoids parameters (Table 23). For Bintje, even if the sum of rutin, quercetin and kaempferol-3-rutinoside content is representative of flavonoids compound measured by the Dualex, other compounds in relation to the leaf N status and measured at 375 nm are accumulated in potato leaves.

The good obtained correlation (Table 23) between Dualex measurements (which determines the content of flavonoids located in the leaf epidermis) and the DR_375 nm (which is an estimate of flavonols content in the whole leaf extracts) supports that, even if flavonoids, are also detected in mesophyll cells to ensure roles such as antioxidant activities (Agati and Tattini 2010), they are mainly located in leaf epidermis (Cerovic et al., 2002).

1.4. Conclusion

The results obtained in the present study indicate that the studied N fertilizers affected the leaf N content of both potato cultivars. The optical flavonoids indices measured by the Dualex showed inverse relationship of leaf flavonoids content and N availability in accordance with previous reported results.

The contrasting N fertilization rates did not show a conclusive effect on the total phenolics content of potato leaves and on the contents of the individual selected phenolic compounds as well. Among the UHPLC measurements, only the DR_375 nm (related to leaf flavonols content) was able to reveal a significant N effect. As N rates decreased, the DR_375 nm increased.

The absence of statistical significance of most of the analytical parameters measured by UHPLC was allocated, firstly, to the high variability at the temporal scale observed between sampling dates. Secondly, the used standards for the identification and quantification of phenolic compounds were not representative for the estimation of the concentration of leaf phenolic compounds and more specifically of flavonols subclass particularly for the cultivar Charlotte. For the cultivar Bintje, the total flavonols content measured as the sum of rutin, quercetin and kaempferol-3-rutinoside content showed an inverse relationship with N content confirming that N deficiency leads to the accumulation of flavonols content. However, as DR_375 nm and optical flavonoids parameters reflect better the leaf N status than the total flavonols content, we could confirm the assumption stating that other compounds not identified in this study in relation to the leaf N status and measured at 375 nm are accumulated in potato leaves. In contrast to Bintje, the sum of rutin, quercetin and kaempferol-3-rutinoside content for Charlotte were neither correlated to leaf N content nor to optical flavonoid measurements. However, as for Bintje, the measured DR_375 nm for Charlotte and related to flavonols compounds is well correlated to leaf N content. Thus, the cultivar had a differential phenolic accumulation and more precisely flavonols variations related to N status.

Considering that the mixed signal of DR_375 nm represents a reasonable estimation of UV absorbing compounds (mainly flavonols compounds) and

according to the higher correlation coefficients calculated between DR₃₇₅ nm and optical flavonoids indices measured by Dualex, we can conclude that this ChlF method can be used to determine the UV absorbing compounds in potato leaves related to N status.

References

- Agati, G., & Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist*, 186(4), 786-793.
- Agati, G., Stefano, G., Biricolti, S., & Tattini, M. (2009). Mesophyll distribution of 'antioxidant' flavonoid glycosides in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance. *Annals of Botany*, 104(5), 853-861.
- Agati, G., Foschi, L., Grossi, N., Guglielminetti, L., Cerovic, Z.G. & Volterrani, M. (2013). Fluorescence-based versus reflectance proximal sensing of nitrogen content in *Paspalum vaginatum* and *Zoysia matrella* turfgrasses. *Europ. J. Agronomy*, 45:39-51.
- Becker, C., Urlić, B., Špika, M. J. et al. (2015). Nitrogen limited red and green leaf lettuce accumulate flavonoid glycosides, caffeic acid derivatives, and sucrose while losing chlorophylls, β -carotene and xanthophylls. *PLoS One*, 10(11), e0142867.
- Ben Abdallah, F. Philippe, W. & Goffart, J. P. (2018). Comparison of optical indicators for potato crop nitrogen status assessment including novel approaches based on leaf fluorescence and flavonoid content, *Journal of Plant Nutrition*, 41:20, 2705-2728, DOI:10.1080/01904167.2018.1510514.
- Bongue-Bartelsman, M., & Phillips, D. A. (1995). Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato [anthocyan]. *Plant Physiology and Biochemistry (France)*.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G, Mita, G., Lattanzio, V. (2015). Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress. Iriti M, ed. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11):26378-26394. doi:10.3390/ijms161125967.

- Cartelat, A., Cerovic, Z.G., Goulas, Y. et al. (2005). Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*, 91:35-49.
- Cerovic Z.G., Ounis A., Cartelat A., Latouche G., Goulas Y., Meyer S. & Moya I. (2002). The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the nondestructive in situ assessment of UV-absorbing compounds in leaves *Plant, Cell & Environment*, 25:1663-1676.
- Chishaki, N., & Horiguchi, T. (1997). Responses of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency. In *Plant nutrition for sustainable food production and environment* (pp. 341-345). Springer, Dordrecht.
- Christensen, K. B., Kaemper, M., Loges, R., Fretté, X. C., Christensen, L. P., & Grevsen, K. (2010). Effects of nitrogen fertilization, harvest time, and species on the concentration of polyphenols in aerial parts and seeds of normal and tartary buckwheat (*Fagopyrum* sp.). *European Journal of Horticultural Science*, 75(4), 153.
- Christie, P. J., Alfenito, M. R., & Walbot, V. (1994). Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, 194(4), 541-549.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Fini, A., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants under abiotic stresses. In *Abiotic stress responses in plants* (pp. 159-179). Springer, New York, NY.
- Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085.
- Estiarte, M., Filella, I., Serra, J., & Penuelas, J. (1994). Effects of nutrient and water stress on leaf phenolic content of peppers and susceptibility to generalist herbivore *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Oecologia*, 99(3-4), 387-391.
- Henriquez, M. A., Adam, L. R., & Daayf, F. (2012). Alteration of secondary metabolites' profiles in potato leaves in response to weakly and highly

aggressive isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 8-14.

Jin, X., Hao, N., Jiao, F., Yang, Y., Wang, D., Xu, C., & Zhai, R. (2014). The effect of nitrogen supply on potato yield, tuber size and pathogen resistance in *Solanum tuberosum* exposed to *Phytophthora infestans*. *African Journal of Agricultural Research*, 9(35), 2657-2663.

Juszczuk, I. M., Wiktorowska, A., Malusá, E., & Rychter, A. M. (2004). Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil*, 267(1-2), 41-49.

Khoddami, A., Wilkes, M., & Roberts, T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.

Kolb, C. A., Käser, M. A., Kopecký, J., Zotz, G., Riederer, M., & Pfündel, E. E. (2001). Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant physiology*, 127(3), 863-875.

Kováčik, J., & Klejdus, B. (2014). Induction of phenolic metabolites and physiological changes in chamomile plants in relation to nitrogen nutrition. *Food chemistry*, 142, 334-341.

Lea, U.S., Slimestad, R., Smedvig, P., Lillo C. (2007) Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta*, 225, 1245–1253.

Lefebvre, T., Millery-Vigues, A., & Gallet, C. (2016). Does leaf optical absorbance reflect the polyphenol content of alpine plants along an elevational gradient?. *Alpine Botany*, 126(2), 177-185.

Lewis, C. E. (1996). Anthocyanins and related compounds in potatoes (*Solanum tuberosum* L.). Doctoral dissertation, University of Canterbury.

Lillo, C., Lea, U. S., & Ruoff, P. (2008). Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, cell & environment*, 31(5), 587-601.

- Løvdal, T., Olsen, K. M., Slimestad, R., Verheul, M., & Lillo, C. (2010). Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry*, 71(5-6), 605-613.
- Michalska, A., Wojdyło, A., & Bogucka, B. (2016). The influence of nitrogen and potassium fertilisation on the content of polyphenolic compounds and antioxidant capacity of coloured potato. *Journal of Food Composition and Analysis*, 47, 69-75.
- Mittelstraß, K., Treutter, D., Pleßl, M., Heller, W., Elstner, E.F., Heiser, I. (2006) Modification of primary and secondary metabolism of potato plants by nitrogen application differentially affects resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Plant Biol*, 8, 653–661.
- Olsen, K.M., Slimestad, R., Lea, U.S. et al. (2009). Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies. *Plant, Cell & Environment* 32: 286–299.
- Ounis, A., Cerovic, Z. G., Briantais, J. M., & Moya, I. (2001). Dual-excitation FLIDAR for the estimation of epidermal UV absorption in leaves and canopies. *Remote Sensing of Environment*, 76(1), 33-48.
- Peng, M., Hudson, D., Schofield, A., et al. (2008). Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the NLA gene. *Journal of experimental botany*, 59(11), 2933-2944.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 28(1), 49-55. Solecka, D. (1997). Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19(3), 257-268.
- Solecka, D. (1997). Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiol Plant*, 19(3), 257-268.

- Stefanelli, D., Goodwin, I., & Jones, R. (2010). Minimal nitrogen and water use in horticulture: Effects on quality and content of selected nutrients. *Food Research International*, 43(7), 1833-1843.
- Stewart, A. J., Chapman, W., Jenkins, G. I., Graham, I., Martin, T., & Crozier, A. (2001). The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant, Cell & Environment*, 24(11), 1189-1197.
- Sytar, O., Zivcak, M., Bruckova, K., Brestic, M., Hemmerich, I., Rauh, C., & Simko, I. (2018). Shift in accumulation of flavonoids and phenolic acids in lettuce attributable to changes in ultraviolet radiation and temperature. *Scientia Horticulturae*, 239, 193-204.
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 218-223.

1.5. Annex 2

Table 24. Tested N factors on the optical flavonoids indices average on cultivars and sampling dates and studied for each experimental year.

	Tested N factor									
	2012					2013				
	Pr	F value	0	100	250	Pr	F value	0	100	250
FLV_abaxial	***	36.02	0.47 ^a	0.38 ^b	0.32 ^c	***	39.34	0.55 ^a	0.4 ^b	0.34 ^b
FLV_adaxial	***	71.28	1.2 ^a	1.02 ^b	0.9 ^c	***	41.1	1.27 ^a	0.98 ^b	0.87 ^c
FLV_total	***	61.19	1.66 ^a	1.4 ^b	1.21 ^c	***	44.86	1.82 ^a	1.38 ^b	1.22 ^c

Analysis of variance of nitrogen (N) effect on the optical flavonoids indices for 2012 and 2013 trials. The (Pr) represents the probability expressed in *** and represents statistical significance at $P \leq 0.001$ and F represents statistical value.

2. Lien avec le chapitre précédent

Le chapitre 5 confirme que la relation inverse, étudiée au niveau du chapitre 4, entre les indicateurs flavonoïdes (mesurés par les fluorimètres) et le statut azoté de la biomasse aérienne traduit une augmentation de la concentration en composés phénoliques foliaires, les flavonols, en réponse à la diminution de la concentration en azote au niveau des feuilles de pomme de terre mesurée pour les deux variétés testées (Bintje et Charlotte).

La sous-classe des flavonols, identifiée pour Bintje comme composée de la rutine, de la quercétine et du kaempférol-3-rutinoside et en lien avec la teneur en azote foliaire, est représentatif des indicateurs flavonoïdes mesurés par le fluorimètre Dualex. Cependant, pour la variété Charlotte, les indicateurs flavonoïdes mesurés par le Dualex ne sont pas reliés à la sous-classe des flavonols identifiée par les standards utilisés. Ceci suggère un effet variétal lié à l'accumulation de composés flavonols spécifiques en relation avec le statut azoté de la culture.

Les hautes corrélations obtenues entre le paramètre analytique, DR₃₇₅ nm (estimant la totalité des flavonols foliaires), et les mesures indirectes de ChlF (fournies par le Dualex), aussi bien en prenant en compte la mesure de la face supérieure de la feuille que les mesures intégrant les deux faces, permettent de conclure que la mesure optique de ChlF acquise au niveau de la face supérieure est représentative du contenu foliaire en flavonols et qui sont en lien avec le statut azoté de la culture. Cet aspect permet de confirmer le critère de justesse des mesures de la ChlF, étudié au niveau du chapitre 4, pour l'évaluation du statut azoté de la culture.

Les mesures optiques, étudiées au niveau du chapitre 4 et liées aux indicateurs flavonoïdes, permettent la détection précoce de la déficience en azote (mesurée entre 7 et 25 jours après émergence de la culture). Cette réponse précoce est également observée, au niveau du chapitre 5, par le paramètre DR₃₇₅ nm qui confirme que la déficience en azote induit une accumulation des flavonols à un stade avancé de la croissance de la culture (mesurée entre 2 à 3 semaines après émergence de la culture).

Chapitre 6

**Synthèse générale, conclusion et
perspectives**

Chapitre 6. Synthèse générale, conclusion et perspectives

1. Synthèse générale

Grâce à nos travaux, nous avons prouvé que l'utilisation de la ChIF fournit une signature prometteuse qui exploite les caractéristiques structurales de l'épiderme et du mésophylle en vue de l'estimation indirecte de composés phénoliques foliaires pour l'évaluation du statut azoté de la culture de pomme de terre.

La revue bibliographique ayant déjà repris les avantages et les inconvénients de deux approches de ChIF, nous ne présentons ici que nos considérations personnelles tirées de nos travaux de recherche et basées sur l'approche spectrale de la ChIF mesurée par les fluorimètres Dualex et Multiplex dans le cadre du suivi du statut azoté de la culture de pomme de terre en plein champ.

Un élément indispensable à notre recherche a été de pouvoir disposer d'une référence en matière d'évaluation du statut azoté de la culture spécifiquement pour la culture de pomme de terre permettant d'une part de définir l'optimum azoté de la culture pour maximiser le rendement en tubercules et d'autre part de valider que les mesures de ChIF peuvent être utilisées comme des « proxies » du statut azoté de la culture de pomme de terre.

- Courbe critique de dilution de l'azote en Belgique pour la culture de pomme de terre

La méthode de référence en matière d'évaluation du statut azoté de la culture est basée sur l'analyse invasive de la plante entière et permet, au départ de la courbe critique de dilution de l'azote, de calculer l'INN. La courbe critique de dilution de l'azote correspond à la teneur minimale en azote requise pour une croissance maximale de la biomasse tout au long de la période de culture.

En l'absence de référence pour la culture de pomme de terre en Belgique, nous avons établi et validé, au niveau du chapitre 3, sur base des données pluriannuelles et multilocales en Wallonie collectées entre 1997 et 2014 en cours de saison et recevant des doses croissantes de fumure azotée, l'équation de la courbe de dilution de l'azote pour la variété Bintje ($N_c (\%) = 5,37 W^{-0,45}$, W : matière sèche totale produite en $t \cdot ha^{-1}$). Notre courbe critique de dilution de l'azote diffère de celle établie en France par Duchenne et al. (1997) et qui est habituellement utilisée pour nos conditions. La courbe de Greenwood et al. (1990), établie pour les variétés Voran et Eigenheimer en Écosse et aux Pays-Bas, présente des paramètres similaires à notre courbe critique de dilution de l'azote.

Nous avons également établi une courbe critique de dilution de l'azote pour Charlotte, sur base d'un nombre plus limité de données que pour Bintje. La courbe établie pour Bintje diffère de celle obtenue pour la variété Charlotte dans les conditions belges (Wallonie). La différence variétale observée entre les deux courbes critiques est sans doute liée au cycle de croissance (dites déterminée pour la variété Charlotte et indéterminée pour la variété Bintje) et à la précocité de la variété Charlotte (plus précoce que la variété Bintje). Ces facteurs déterminent la production maximale de matière sèche et donc une dilution différenciée de l'azote dans la biomasse végétale. En l'absence de données suffisantes pour la variété Charlotte, seule la courbe de dilution de l'azote pour la variété Bintje a été considérée comme une référence en Belgique pour notre travail. Des données supplémentaires sont nécessaires pour augmenter la robustesse et vérifier la validation de la courbe critique de dilution de l'azote pour la variété Charlotte.

L'INN, dérivant de la courbe N_c pour Bintje, a permis d'identifier de manière adéquate les situations limitantes et non limitantes en azote permettant ainsi d'évaluer le statut azoté de la culture de pomme de terre. La relation entre le rendement relatif (calculé comme le rapport entre le rendement en tubercules obtenu pour un niveau de fumure donnée et le rendement le plus élevé obtenu parmi tous les niveaux de fumure testés) et l'INN (mesuré entre 20 et 55 jours après émergence, JAE) est exprimée par une courbe quadratique plateau. Cette relation confirme la pertinence de l'INN pour prédire le rendement atteignable en valeur relative par rapport au rendement maximum observé dans plusieurs situations. Il est donc légitime d'affirmer que l'estimation du statut azoté de la biomasse entre 20 et 55 JAE permet d'ajuster la fertilisation azotée de la culture en cours de saison pour rencontrer l'objectif final à la récolte qui est d'atteindre un rendement maximum espéré. La relation entre le rendement relatif et l'INN a permis de déterminer l'optimum de nutrition azotée pour la culture de pomme de terre dans les conditions belges, caractérisé par un INN autour de 1,16 sur base du type de relation choisie (approche linéaire-plateau).

Cependant, l'établissement de l'INN nécessite un échantillonnage invasif des plantes et l'analyse chronophage de la teneur en azote au niveau de la biomasse qui limite l'application de cette méthode dans le cadre pratique d'une gestion de la fertilisation azotée en cours de saison. Ainsi, au lieu de miser sur la mesure invasive à l'échelle de la plante entière, nous avons exploité les propriétés de ChlF à l'échelle foliaire comme méthode indirecte compatible avec une évaluation rapide en cours de saison du statut azoté de la culture.

La méthode de référence, établie pour nos conditions, a servi dans la suite du travail de cette thèse à vérifier la justesse des méthodes de ChlF pour l'évaluation du statut azoté de la culture.

L'originalité de cette étude repose sur l'approche constitutive de la ChlF qui, contrairement à l'approche classiquement abordée par la majorité des études, repose sur l'estimation des indicateurs foliaires plutôt que sur l'estimation de l'activité photosynthétique de la plante. Contrairement aux signatures spectrales usuellement utilisées pour l'évaluation du statut azoté et qui se réfère à l'estimation de la teneur en chlorophylle des feuilles par des approches reliées à la réflectance ou à la

transmittance, nos travaux reposent sur les mesures de ChlF liées à l'estimation de la teneur en composés phénoliques des feuilles (les flavonoïdes de façon générale et la sous-classe des flavonols en particulier en relation avec la longueur d'onde d'excitation utilisée par les fluorimètres).

- **Potentialités offertes par la fluorescence chlorophyllienne**

Par la comparaison des mesures optiques non invasives réalisées sur le feuillage en cours de saison avec les fluorimètres Dualex et Multiplex (Force-A, Orsay, France), un radiomètre (Cropscan, Cropscan Inc, Rochester, USA) et un chlorophyllomètre (HNT Hydro N-Tester, Yara, Oslo, Norway), les potentialités de la ChlF liées à l'estimation de la teneur en flavonoïdes des feuilles ont été étudiées durant trois années d'expérimentation, au niveau du chapitre 4, pour évaluer le statut azoté de deux variétés de pommes de terre cultivées en plein champ et recevant des doses croissantes de fumure azotée. Nous avons montré que la prise en considération de la teneur en flavonoïdes des feuilles, mesurée par le rapport de ChlF dans le proche infrarouge excitée sous deux longueurs d'onde, est particulièrement intéressante dans le cadre de l'évaluation du statut azoté de la culture de pomme de terre. Les indicateurs combinant la teneur en flavonoïdes à la teneur en chlorophylle des feuilles répondent positivement aux critères investigués (sensibilité, précocité de détection et exactitude) et sont les plus pertinents pour l'évaluation du statut azoté de la culture comparativement aux indicateurs considérant uniquement la chlorophylle ou les flavonoïdes.

Sensibilité

Nous avons prouvé la sensibilité de réponse des indicateurs basés sur l'estimation de la teneur en flavonoïdes des feuilles et particulièrement des indicateurs flavonoïdes couplés aux indicateurs chlorophylle pour l'évaluation du statut azoté de la culture.

Ces indicateurs foliaires, seuls ou combinés, permettent la discrimination entre les niveaux d'azote testés pour l'ensemble des dates de mesures et montrent un effet significatif du facteur azote pour chaque date de mesure étudiée séparément. À partir du calcul du rapport de sensibilité qui permet d'évaluer des statuts très contrastés en azote, nous avons classé les indicateurs combinant flavonoïdes et chlorophylle comme les indicateurs les plus sensibles au facteur azote. La prise en compte de la chlorophylle et des flavonoïdes améliore la sensibilité vis-à-vis du statut azoté de la culture comparativement aux indicateurs liés uniquement à la teneur en chlorophylle et mesurés par réflectance (cas du Cropscan) ou transmittance (cas du Hydro-N tester). En effet, la réaction inverse de la chlorophylle et des flavonoïdes, vis-à-vis du statut azoté, accroît la discrimination entre les traitements azotés (Cerovic et al., 2012 ; Agati et al., 2013).

Précocité de détection

L'approche spectrale de la ChlF, relative à l'accumulation des flavonoïdes au niveau des feuilles de pommes de terre et mesurée par les fluorimètres portables, est une signature précoce (réponse observée entre 7 et 25 JAE de la culture) permettant la détection d'une carence en azote de la plante plus rapide que les détections basées sur les changements de réflectance ou de transmittance liés uniquement à la diminution de la concentration en chlorophylle des feuilles. À partir des données analytiques de chromatographie liquide (présentées au niveau du chapitre 5), le paramètre DR₃₇₅ nm mesuré entre 2 à 3 semaines après émergence de la culture et relié à la teneur en flavonols foliaires, confirme que cette réponse précoce estimée indirectement par les fluorimètres portables est bien liée à une accumulation des flavonols au niveau des feuilles carencées en azote. Cette précocité de réponse de la ChlF pour la détection du statut azoté de la plante a également été observée pour le maïs (Samson et al., 2000; Longchamps et al. 2014). Pour la pomme de terre, la détection d'une déficience en azote apparaît, logiquement, entre 2 à 3 semaines après émergence de la culture puisque la plante en début de développement vit des réserves du tubercule mère. Cependant, l'accumulation précoce des flavonoïdes particulièrement aux alentours de 7 JAE de la culture pourrait être liée à une perception de la déficience du sol en azote par le système racinaire encore peu développé et qui serait à l'origine de la réponse de la plante au stress azoté et à une augmentation de l'expression de gènes de biosynthèse des flavonoïdes.

Exactitude de la mesure

En termes d'exactitude des indicateurs mesurés par les différents outils optiques testés au niveau de nos travaux, nous avons démontré que les indicateurs flavonoïdes, couplés ou non aux indicateurs chlorophylle, présentent une bonne justesse de mesure (évalué sur base de corrélation avec la teneur en azote de la biomasse aérienne et de la plante entière) et une plage de répétabilité adéquate (évaluée sur base de la variation entre les répétitions testées). Pour la variété Bintje, des coefficients de corrélations significatifs élevés sont obtenus entre l'INN (calculé à partir de la courbe Nc établie en Belgique) et les indicateurs flavonoïdes, combinés ou non aux indicateurs chlorophylles, confirmant ainsi la relation étroite de ces indicateurs avec le statut azoté de la culture.

Concernant les mesures de réflectance, les corrélations obtenues, pas toujours significatives, varient en fonction de la date de mesures et donc du développement de la culture. La corrélation de ces indices avec la teneur en azote de la culture fournit des tendances contradictoires lorsque la corrélation est établie sur base d'une date de mesure individuelle ou sur l'ensemble des dates de mesures. Par exemple, l'indice R montre des corrélations positives avec la teneur en azote de la culture pour chaque date de mesure et des corrélations négatives pour l'ensemble des dates. Ces réponses contradictoires, observées également par Xue et al. (2004), traduisent le manque de stabilité de ces mesures de réflectance vis-à-vis de la détection du statut azoté de la culture en fonction du stade de croissance.

Les mesures Hydro-N tester, basées sur la transmittance, présentent également de bonnes corrélations avec les exportations d'azote, mais qui sont observées en général, plus tardivement en cours de cycle comparativement aux mesures de ChlF.

Spécificité

La limitation majeure, pointée au niveau de ce travail de recherche concerne le critère de la spécificité des indicateurs foliaires qui n'est pas exclusivement reliée à la fourniture en azote.

Il est à noter que certains facteurs tels que la variété, l'année ou la date de mesure influencent les indicateurs testés. Comparativement aux valeurs absolues, l'utilisation des valeurs relatives à une fenêtre de référence surfertilisée ou une fenêtre non fertilisée nous a permis de diminuer l'interférence de ces facteurs et d'améliorer la faible spécificité des indicateurs à l'azote. L'intérêt des valeurs relatives des outils optiques versus valeurs absolues a également été démontré, permettant d'atténuer voire supprimer l'influence de facteurs non liés aux besoins en azote de la culture (Schröder et al., 2000 ; Goffart et al., 2013).

La tendance croissante des valeurs des indicateurs flavonoïdes issus des mesures acquises par les fluorimètres portables pour des niveaux de fumures azotées décroissants traduit l'augmentation de la teneur de ces composés au niveau des feuilles de pomme de terre avec la déficience en azote. Ce lien a été vérifié au niveau du chapitre 5 par des mesures analytiques des concentrations en composés phénoliques en réponse à des variations de concentrations en azote au niveau des feuilles de deux variétés de pommes de terre (Bintje et Charlotte) en plein champ.

- Relation entre « indicateurs phénoliques et statut azoté » de la culture

À partir des données de chromatographie liquide à haute pression (méthode UHPLC permettant la quantification et l'identification de composés phénoliques spécifiques), du dosage de Folin-Ciocalteu (permettant la quantification globale des composés phénoliques totaux) et du dosage de l'azote dans les feuilles (méthode Dumas), nos travaux ont permis de confirmer l'hypothèse de départ concernant la relation entre la sous-classe des flavonols en particulier et le statut azoté de la culture de pomme de terre. Le paramètre DR₃₇₅ nm, calculé à partir des données UHPLC comme la somme des hauteurs des pics extraits du chromatogramme normalisé à 375 nm et relié à l'estimation de la teneur en flavonols des feuilles, a permis de mettre en évidence un effet significatif des doses d'azote testées particulièrement entre les niveaux de fumures contrastés. Ce paramètre présente de bonnes corrélations négatives avec la teneur en azote des feuilles suggérant ainsi la relation qui peut exister entre les teneurs en composés phénoliques et la mise en évidence du statut azoté de la biomasse étudiée pour les deux variétés de pommes de terre en plein champ.

Ni la quantification des composés phénoliques totaux des feuilles, ni celle des classes spécifiques des composés flavonols (rutine, quercétine et kaempférol-3-

rutinoside) et des acides phénoliques (acide cryptochlorogénique, acide néochlorogénique et acide coumarique) prises individuellement, n'a permis d'apporter de preuve définitive traduisant la relation entre ces composés et les niveaux d'azote testés.

Cependant, sur base des corrélations établies, les flavonols totaux mesurés pour Bintje comme la somme de la teneur en rutine, quercétine et kaempférol-3-rutinoside sont bien reliés aux composés phénoliques mesurés par le Dualex et à la teneur en azote des feuilles. Pour la variété Charlotte, ces standards utilisés sont peu représentatifs du contenu total en composés flavonols accumulés au niveau des feuilles et qui sont reliés au statut azoté. Ceci suggère un effet variétal lié à l'accumulation de composés flavonols spécifiques en relation avec le statut azoté de la culture.

Les mesures optiques acquises au moyen du fluorimètre Dualex parallèlement aux mesures analytiques nous ont permis de conclure que la méthode non invasive de ChlF peut être utilisée pour estimer indirectement la teneur en composés flavonols dans les feuilles de pomme de terre en lien avec le statut azoté de la culture. Les hautes corrélations obtenues entre le DR₃₇₅ nm (estimant la totalité des flavonols foliaires) et les mesures optiques fournies par le Dualex aussi bien en prenant en compte la mesure de la face supérieure de la feuille que les mesures intégrant les deux faces, soutiennent que, même si les flavonoïdes sont également détectés dans les cellules du mésophylle (Agati et al., 2010), ils sont principalement situés dans l'épiderme des feuilles (Cerovic et al., 2002). Cet aspect d'échantillonnage, relié à la mesure optique de ChlF acquise au niveau de la face supérieure et qui est représentative du contenu foliaire en flavonols en lien avec le statut azoté de la culture, est important dans le cadre d'une mise en œuvre pratique et facile d'utilisation de la mesure de la ChlF.

2. Conclusion

Au travers de cette thèse, nous avons comme objectif de répondre à trois questions de recherches. Nous reprenons ci-dessous les trois questions et les réponses que nous y avons apportées.

1. *Quelle est la méthode de référence spécifique pour la culture de pomme de terre dans les conditions belges permettant d'évaluer le statut azoté de la culture et de définir l'optimum azoté de la biomasse durant la saison de culture ?*

L'établissement de la relation caractérisant la courbe critique de dilution de l'azote ($N_c (\%) = 5,37 W^{-0,45}$, W : matière sèche totale produite en $t \cdot ha^{-1}$) pour la variété Bintje constitue la méthode de référence, en Belgique, qui via l'établissement de l'INN (défini comme le rapport entre la teneur actuelle en azote et la teneur critique

en azote de la biomasse aérienne à tout moment de la culture), permet la détermination du statut azoté pour l'identification des situations limitantes et non limitantes en azote. Nous avons pu mettre en évidence que l'optimum de nutrition azotée pour la culture de pomme de terre, permettant de maximiser le rendement en tubercules, correspond à un INN de l'ordre de 1.16. Cet optimum est fixé dans les conditions belges sur base de la relation linéaire-plateau choisie dans notre étude entre l'INN et le rendement relatif.

II. Parmi les méthodes indirectes d'évaluation du statut azoté des cultures, quelles sont les caractéristiques des mesures de la ChlF, liées à la teneur en composés phénoliques des feuilles, qui en font un outil pertinent pour la culture de pomme de terre dans un cadre pratique de la gestion de sa fertilisation azotée?

Parmi les méthodes indirectes, la ChlF liée à l'estimation des composés phénoliques des feuilles est une signature qui apparaît intéressante, via ce travail de thèse, pour l'évaluation du statut azoté de la culture de pomme de terre. L'utilisation de rapports de fluorescence du proche infrarouge induite sous deux excitations (UV et rouge) et mesurée à partir des fluorimètres de terrain (le Dualex et le Multiplex) permet d'estimer la teneur des flavonoïdes des feuilles et en particulier la sous-classe des flavonols qui sont majoritairement présents dans l'épiderme des feuilles et qui ont la propriété d'absorber les rayonnements UV. La prise en considération des indicateurs flavonoïdes combinés à la teneur en chlorophylle des feuilles est la méthode la plus pertinente pour l'évaluation du statut azoté de la culture par rapport aux méthodes basées sur la réflectance ou transmittance.

Les potentialités de ces indicateurs de ChlF se déclinent via la sensibilité de réponse tout particulièrement en couplant les indicateurs flavonoïdes aux indicateurs chlorophylle, via la détection précoce de la déficience en azote (liée à l'accumulation des flavonoïdes dans les feuilles), et via l'exactitude (justesse et répétabilité) de la mesure de ChlF pour l'évaluation de teneur en azote au niveau de la plante.

En raison de la faible spécificité de la chlorophylle et des flavonoïdes pour l'évaluation du statut azoté, il est préconisé au départ de nos résultats de travailler avec des valeurs relatives des mesures plutôt qu'avec des valeurs absolues de ces mesures.

III. À l'échelle des feuilles de pomme de terre, les variations de concentrations en azote sont-elles en relation avec des variations de concentration en composés phénoliques ou de classes spécifiques de composés phénoliques (tel que les flavonols)?

Ni la quantification des composés phénoliques totaux, ni celle des sous-classes spécifiques des composés flavonols et des acides phénoliques n'ont permis d'apporter de preuve définitive de la relation entre ces composés et les variations de

concentrations en azote. Cependant, les mesures analytiques de chromatographie liquide à haute performance liées à la teneur totale en flavonols ont démontré l'impact de la nutrition azotée sur la variation de ces composés phénoliques au niveau des feuilles de pomme de terre. L'estimation du paramètre DR₃₇₅ nm montre, en effet, que la déficience en azote mène à l'accumulation des composés flavonols au niveau des feuilles de pomme de terre cultivée en plein champ. La quantification de la teneur totale en flavonols, déterminée à partir de la somme de la teneur en rutine, quercétine et kaempférol-3-rutinoside et mesuré pour la variété Bintje, est bien reliée d'une part, aux mesures optiques de ChlF et d'autre part, à la teneur en azote des feuilles. Cependant, l'identification et la quantification d'autres composés spécifiques de type flavonols dont l'accumulation est reliée au statut azoté de la culture n'ont pas été possibles au niveau de ce travail de thèse, particulièrement pour la variété Charlotte.

3. Perspectives

Amélioration des potentialités des indicateurs du statut azoté

Tout d'abord, étant donnée l'importance de la relation « composés phénoliques - statut azoté de la culture », une meilleure compréhension du rôle de ces composés dans la physiologie des plantes sous condition de stress environnementaux est essentielle et requiert des méthodes appropriées permettant d'atteindre cet objectif. Il est ainsi nécessaire d'identifier de manière plus précise, à partir du paramètre DR₃₇₅ nm, les classes phénoliques des feuilles de pomme de terre sensibles aux variations analytiques des doses d'azote testées en plein champ. Le paramètre DR₃₇₅ nm est un paramètre intégratif qui peut également être lié à l'absorbance de composés non phénoliques. La limitation de la méthode analytique utilisée, observée au niveau de cette thèse et liée à la diversité structurelle des composés flavonoïdes, peut être contournée en couplant la chromatographie liquide à haute performance à un spectromètre de masse. La combinaison des données de temps de rétention, des spectres d'absorbance, de la masse moléculaire et des spectres de masse pourrait fournir une information sélective, sensible et plus complète sur les composés phénoliques dans leur matrice complexe.

Par ailleurs, les potentialités des indicateurs flavonoïdes mesurés par ChlF ont été étudiées sur base de leur relation avec le statut azoté de la culture de pomme de terre. Cependant, en tenant compte de la relation étroite de la concentration en azote avec la teneur en matière sèche des plantes et l'indice de surface foliaire (Gastal et al., 2002), l'estimation dynamique de la concentration en azote de la plante et de ces deux paramètres qui en dépendent devrait être utile dans le cadre de l'évaluation du statut azoté de la culture tout au long de la saison. De ce fait, un bon indicateur du statut azoté de la culture est celui qui permet non seulement l'estimation de la teneur en azote de la plante, mais aussi l'estimation de la matière sèche des plantes et de

l'indice de surface foliaire. Cerovic et al. (2012) suggèrent de prendre les flavonoïdes en particulier comme des indicateurs de la masse foliaire par unité de surface. Les flavonoïdes présentent en effet une très bonne corrélation avec la masse foliaire par unité de surface puisque ces deux paramètres sont contrôlés par l'irradiance de la feuille (Meyer et al., 2006). Dans ce contexte, il est nécessaire de vérifier les relations entre les indicateurs flavonoïdes, seuls et/ou combinés à la teneur en chlorophylle, et la matière sèche des plantes ainsi que l'indice de surface foliaire.

Les potentialités des indicateurs ont été évaluées en cours de saison en fonction du stade de la culture exprimé sur base de l'échelle « JAE (jours après émergence) ». L'utilisation d'une échelle thermique, comme les sommes de températures, par exemple, plutôt que les JAE, permet d'obtenir une réponse polyvalente dans le cadre d'un suivi du statut azoté de la culture permettant de mieux prendre en compte différentes dates de plantation, différentes saisons culturales et différents sites d'expérimentation. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons démontré la faible spécificité des indicateurs (mesurés en valeurs absolues) liée à l'interférence, entre autres au facteur « année d'expérimentation ». L'utilisation de l'échelle thermique peut être une solution permettant de diminuer l'effet de ce dernier paramètre. Il importe de noter toutefois qu'une échelle thermique est moins pratique d'utilisation que l'échelle « JAE » qui, sur base de la détection de la date d'émergence complète de la culture, permettra à l'agriculteur de raisonner lui-même ses apports d'engrais azotés complémentaires via des indicateurs basés sur des mesures optiques destinées à être réalisées sur des périodes déterminées de la culture (dans notre cas entre 20 et 55 JAE, et idéalement entre 30 et 40 jours JAE).

La combinaison « recommandation en engrais azoté » et « outils de mesure du statut azoté »

Notre approche de raisonnement de la fertilisation azotée s'inscrit dans un contexte de fractionnement des apports d'engrais azoté de synthèse pour mieux coïncider avec les besoins de la culture. Cette approche s'appuie sur l'établissement d'une dose totale recommandée prévisionnelle en azote, basée sur un objectif de rendement a priori via la méthode du bilan prévisionnel en azote, et son ajustement en cours de saison par l'utilisation d'outils d'aide à la décision tels que les indicateurs du statut azoté de la culture développés dans ce travail de thèse. En culture de pomme de terre, l'application recommandée de 70% de la dose prévisionnelle à la plantation pourrait être potentiellement revue à la baisse sachant qu'en début du cycle de croissance de la culture, qui correspond à la phase de germination, le tubercule-mère est la principale source de nutriments et d'énergie pour la plante en développement et l'absorption de l'azote dans le sol est réduite (Zebarth et al., 2007). La phase qui s'en suit correspond au début de la phase végétative et au développement et à la croissance du système racinaire. À la fin de cette phase, qui couvre quelque 20 jours après l'émergence, l'absorption de l'azote minéral disponible (issu du sol et de l'engrais appliqué) par la culture représente de

l'ordre de 20 à 30% d'absorption totale et donc des doses élevées d'engrais azotés appliquées avant ou au début de ce stade peuvent augmenter les risques de pertes d'azote par lessivage des nitrates et d'émission d'oxyde nitreux, contribuant à l'émission de gaz à effet de serre (Zebarth et al., 2007). Cependant, il faut garder en tête le cycle court de la culture et que les apports tardifs en culture de pomme de terre retardent la maturité de la culture et peuvent donc être préjudiciables à la qualité des tubercules qui doivent être conservés durant de longs mois après la récolte. Il est ainsi conseillé, dans un contexte de raisonnement de la fertilisation azotée, de déterminer le niveau de réduction possible de la dose d'azote appliquée à la plantation tout en veillant à ne pas pénaliser le rendement final par un manque de disponibilités en azote durant les premières semaines après l'émergence de la culture. Cette évaluation doit être réalisée en tenant compte des conditions édaphiques liées aux événements climatiques (disponibilité en eau principalement), du choix variétal (en tenant compte de la précocité, de l'efficacité d'utilisation de l'azote et du caractère de croissance déterminée ou indéterminée de la variété) et enfin des modalités d'apport des engrais azotés (forme des fertilisants et dates d'application). Cette approche doit encore être affinée pour être combinée avec les mesures de suivi du statut azoté, particulièrement basé sur les indicateurs de ChlF, dans une optique de gestion optimale des apports d'engrais azotés en culture de pomme de terre.

Les valeurs seuils des indicateurs d'entrée en carence azotée

Dans la perspective de la mise en œuvre opérationnelle des mesures de ChlF comme outil d'évaluation du statut azoté, l'étape suivante est d'établir des valeurs seuils des indicateurs pertinents retenus permettant de décider de la nécessité d'un apport complémentaire d'engrais azoté minéral en cours de saison. L'établissement des valeurs seuils implique de déterminer une référence en matière d'évaluation du statut azoté de la culture permettant de calibrer les mesures de ChlF. L'INN calculé à partir de la courbe critique de dilution de l'azote et établie pour la variété Bintje en Belgique peut être utilisé pour générer des valeurs seuils des indicateurs de ChlF. Il est essentiel, néanmoins, de vérifier la nécessité d'établir des références par variété ou groupe variétal (tenant compte de la précocité de la culture et du type de valorisation de la récolte) dans nos conditions. Ce travail a déjà été entamé en marge de cette thèse.

L'INN seuil, établi entre 20 et 55 jours après émergence de la culture pour la variété Bintje, correspond à une valeur de 1,16 (selon l'approche statistique choisie) qui est supérieure à l'optimum azoté de 1 permettant d'atteindre la production maximale théorique en matière sèche totale (biomasse aérienne et tubercules). Cette valeur constante représente un statut optimal de la nutrition azotée permettant de maximiser le rendement en tubercules. Cette maximisation du rendement attendu est le fondement de l'approche de la recommandation azotée, basée sur le bilan en azote prévisionnel, tel qu'appliqué dans cette étude et aussi dans la pratique. Cependant, un nouveau concept récent pour s'affranchir de l'incertitude sur l'objectif de

rendement a priori est en cours de développement (notamment en France) en culture de froment d'hiver. Sur cette base, un INN minimum ($INN < 1$) et évolutif (en fonction du stade de développement de la culture) a été établi déterminant un niveau seuil de carence azotée acceptable, c'est-à-dire pour lequel une plante peut supporter une carence azotée temporaire (niveau sous-optimal) sans perte de rendement (Ravier, 2017). Ce travail fait appel à la notion du stress utile, acceptable et recommandé pour la plante, qui permet d'améliorer l'efficacité d'utilisation de l'engrais par la réduction des doses d'engrais apportées (lorsque celles-ci ne sont pas préjudiciables au rendement) et l'application des apports lorsque la cinétique d'absorption de l'azote est importante (en conditions de sol non limitantes en eau). En culture de pomme de terre, cette notion de stress azoté utile pourrait être prise en compte dans une optique de réduction des apports azotés. Cependant, il faut garder à l'esprit que, comparativement à la culture de froment d'hiver où le fractionnement des apports azotés est utilement pratiqué, en pomme de terre, lorsque qu'une carence azotée est apparue en phase végétative, et ce de manière préjudiciable au rendement final, cette espèce ne dispose pas d'autant de capacité de compensation physiologique que le froment en termes de croissance à des stades phénologiques ultérieurs. Le concept de conduite de la fertilisation azotée en conditions sous-optimales de nutrition azotée doit donc être considéré avec prudence pour la culture de pomme de terre.

Toujours dans la même optique de développement d'un outil d'aide à la décision pour le raisonnement de la fertilisation azotée, l'utilisation préconisée des valeurs relatives des mesures de ChlF permettant d'améliorer la spécificité des mesures en prenant en compte une fenêtre surfertilisée ou une fenêtre sans apport d'azote peuvent être utilisées pour l'établissement des valeurs seuils d'entrée en carence azotée. Le principe théorique de l'utilisation d'une fenêtre surfertilisée permet de déterminer une carence en azote dans la parcelle si la valeur de la ChlF mesurée dans un champ est plus faible par rapport à la fenêtre surfertilisée : c'est le principe du NSI (Nitrogen Sufficiency Index). À l'inverse, la considération d'une fenêtre témoin non fertilisée permet de mettre en évidence une différence entre la valeur de la ChlF mesurée dans un champ et celle mesurée dans la fenêtre sans apport d'azote. Le principe du témoin sans apport d'azote permet de conscientiser l'agriculteur par rapport aux fournitures de sa parcelle en azote minéral du sol. Cependant, en considérant l'aspect pratique, la nécessité de mise en place au niveau du champ d'une fenêtre surfertilisée ou sans apport d'azote est fastidieuse et consommatrice de temps pour l'agriculteur. Une solution serait d'envisager une parcelle de référence unique dans une région délimitée et où le travail est réalisé par un entrepreneur ayant plusieurs sites d'exploitations pour une même culture/variété dans des conditions pédoclimatiques similaires.

Il est également important de tenir compte de l'aspect technico-économique de ces outils de ChlF qui doivent être applicables et utilisables pour le raisonnement de la fertilisation azotée pour d'autres cultures afin de diminuer le coût lié à l'achat ou à la mise en œuvre de ces fluorimètres.

L'estimation de la dose complémentaire d'engrais azoté à appliquer

Un autre défi important reste de déterminer, dans le cadre d'une stratégie de fractionnement des apports, la dose complémentaire d'engrais azoté à appliquer lorsque les outils détectent une entrée en carence azotée. Le calcul de la dose d'azote à ajouter en cours de culture doit être corrigé sur base de la saison climatique et de l'évolution de la culture et du rendement attendu en tubercules. Une des possibilités pour atteindre cet objectif est de combiner les mesures de ChlF avec des modèles de simulation de croissance des cultures. À partir de variables d'entrée (intégrant des paramètres climatiques ou météorologiques, le sol, et les pratiques agricoles), les modèles de simulation de croissance des cultures permettent d'estimer les caractéristiques de la production agricole telles que le rendement des cultures, la qualité des produits récoltés, ainsi que les prélèvements d'azote et d'eau par la plante. Ces modèles combinés aux indicateurs flavonoïdes mesurés par ChlF peuvent potentiellement être très utiles en cours de culture pour ajuster notamment les apports d'engrais azoté en fonction des conditions climatiques et de l'état de la plante. D'une part, la comparaison des besoins en azote de la plante simulés à un moment donné et les exportations réelles en azote estimées indirectement par les indicateurs flavonoïdes permet de calculer la quantité complémentaire d'engrais azoté à ajouter en cas de déficience; et d'autre part, l'utilisation des outils de ChlF pourrait permettre d'estimer certaines variables en cours de saison augmentant ainsi la précision des modèles qui reposent sur des variables simulées. Les paramètres physiologiques simulés, tels que le LAI ou bien la biomasse de la plante, peuvent être affinés en prenant en compte les indicateurs flavonoïdes mesurés par ChlF sur base des corrélations possibles décrites plus haut entre les flavonoïdes et la masse foliaire par unité de surface.

Par ailleurs, les modèles de croissance comme DAISY (Hansen et al., 2012) ou STICS (Brisson et al. 1998) tiennent compte de la notion d'azote critique nécessaire pour une maximisation de la matière sèche de la plante. La courbe critique de dilution de l'azote utilisée au niveau de STICS est celle définie pour la pomme de terre et établie en France par Duchenne et al. (1997). Cette courbe, comme évoqué dans ce travail, diffère de la courbe établie en Belgique dans le cadre de cette thèse. La prise en compte de cette dernière courbe spécifique pour la variété Bintje et pour les conditions belges pourrait être une piste permettant d'améliorer la calibration de ces modèles de croissance dans l'optique d'une gestion raisonnée de la fertilisation azotée.

La représentativité des mesures des indicateurs à l'échelle de la parcelle agricole

Les outils ChlF utilisés au niveau de notre travail permettent un « proxy sensing » de la culture qui nécessite de prendre des mesures ponctuelles au champ et ne sont pas nécessairement représentatives de l'hétérogénéité à l'échelle de l'ensemble de la parcelle. Une autre perspective, encore à étudier dans le cadre de l'étude de la

faisabilité opérationnelle de ces mesures optiques, est la mesure des potentialités des indicateurs pertinents basée sur la télédétection rapprochée (« near remote sensing ») au moyen de la version embarquée d'un appareil comme le Multiplex permettant des mesures dynamiques de ChlF. Les techniques de ChlF active embarquées sont encore rarement utilisées ou en cours de recherche (pour la version embarquée du Multiplex). Elles nécessitent une distance réduite entre le couvert végétal et le capteur (afin de détecter le signal faible de fluorescence) et une excitation des feuilles avec la même quantité d'énergie lumineuse. Ce type d'outil pourrait être valorisé dans un contexte d'agriculture de précision permettant de gérer en temps réel les différents états de nutrition azotée au sein de la parcelle et en commandant directement la distribution d'engrais là où l'azote apporté sera le plus efficient intégrant ainsi la variabilité intraparcellaire.

La combinaison d'indicateurs

Enfin, les potentialités des mesures de ChlF combinées aux mesures de réflectance pourraient pallier à certaines limitations de l'utilisation d'une signature unique. En fusionnant les données de ces différentes signatures, leurs limites peuvent être réduites, puisque les données peuvent être plus informatives et complémentaires. En ce sens, les approches de fusion de données pourraient augmenter la performance de détection du statut azoté de la culture en combinant les nombreuses données obtenues par des capteurs complémentaires.

Références bibliographiques

- Agati G. et al. 2013. Fluorescence-based versus reflectance proximal sensing of nitrogen content in *Paspalum vaginatum* and *Zoysia matrella* turfgrasses. *Eur J Agron*, 45, 39-51. doi.org/10.1016/j.eja.2012.10.011.
- Agati G., & Tattini M. 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol*, 186(4), 786-793.
- Brisson N. et al. 1998. STICS: a generic model for the simulation of crops and their water and nitrogen balances. I. Theory and parameterization applied to wheat and corn. *Agronomie*, 18, 311-346.
- Cerovic Z.G. et al. 2012. A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoid. *Physiol Plant*, 146: 251-260. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01639.

- Cerovic Z.G., et al. 2002. The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the nondestructive in situ assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant, Cell & Environment*, 25:1663-1676.
- Duchenne T., Machet J.M., Martin M. 1997. In: Lemaire G (ed) *Diagnosis of the nitrogen status in crops*. Springer, Berlin, pp 119–130.
- Gastal F. & Lemaire G. 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *J Exp Bot*, 53(370), 789-799.
- Goffart J.P., Abras M. & Ben Abdallah F. 2013. Gestion de la fertilisation azotée des cultures de plein champ. Perspectives d'amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'azote sur base du suivi du statut azoté de la biomasse aérienne. *BASE*, 17(1) : 221-230. <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=9703>.
- Greenwood D.J. et al. 1990. Decline in percentage N of C3 and C4 crops with increasing plant mass. *Ann Bot*, 66:425–436
- Hansen S., Abrahamsen P., Petersen C. T., & Styczen M. 2012. Daisy: Model use, calibration, and validation. *Trans. ASABE*, 55(4), 1315-1333.
- Longchamps L. & Khoslaa R. 2014. Early Detection of Nitrogen Variability in Maize Using Fluorescence. *Agron J*. 106. 511-518. 10.2134/agronj2013.0218.
- Meyer S. et al. 2006. Relationships between optically assessed polyphenols and chlorophyll content and the dry mass per leaf area ratio of woody plants: a signature of the carbon and nitrogen balance within leaf? *Plant Cell Environ*;29:1338–1348.
- Ravier C. 2017. Conception innovante d'une méthode de fertilisation azotée : Articulation entre diagnostic des usages, ateliers participatifs et modélisation. *Sciences agricoles. Thèse de recherche*. Université Paris-Saclay.
- Samson G. et al. 2000. Nutrient stress of corn plants: early detection and discrimination using a compact multiwavelength fluorescent lidar. In *Proceedings of the 20th EARSeL Symposium, Dresden, Germany* (pp. 214-223).

- Schröder J.J., Neeteson J.J., Oenema O., & Struik P.C. 2000. Does the crop or the soil indicate how to save nitrogen in maize production? Reviewing the state of the art. *Field Crops Res*, 66: 151-164. doi: 10.1016/S0378-4290(00)00072-1.
- Xue L. et al. 2004. Monitoring leaf nitrogen status in rice with canopy spectral reflectance. *Agrono J.* 96(1): 135-142. doi:10.2134/agronj2004.1350.
- Zebarth B. J., & Rosen C. J. 2007. Research perspective on nitrogen BMP development for potato. *American Journal of Potato Research*, 84(1), 3–18.