

## LA NUTRITION AZOTÉE CHEZ LE ROBINIER (*Robinia pseudoacacia* L.)

SAIDI F.<sup>1</sup>, CHAOUIA C.<sup>2</sup>,  
CHERIF H.S.<sup>1</sup>, ROUIBI A.<sup>1</sup>,  
OUSSADOU L.<sup>1</sup>,  
HAMAIIDI F.<sup>1</sup>,  
HAMAIIDI M.S.<sup>1</sup>,  
FEKNOUS S.<sup>1</sup>,  
CHABANE D.<sup>1</sup> et  
BENOUAKLIL F.<sup>1</sup>

saidifairouz@yahoo.fr

1 : département de biologie  
2 : département d'agronomie

### Résumé

Dans la nature, le robinier ou faux acacia (*Robinia pseudoacacia*L) peut subvenir à ses besoins nutritifs en utilisant deux sources azotées : l'azote du sol et la fixation de l'azote atmosphérique grâce à une bactérie du genre rhizobium. Les résultats ont montré que les jeunes robiniers cultivés au laboratoire présentent une activité nitrate réductase constitutive mais qu'en présence de son substrat, le nitrate (2mM), elle était inductible. Dès que l'activité nitrogénase est fonctionnelle, la nitrate réductase constitutive s'annule. La lumière est un facteur important dans le phénomène de la fixation. En effet, un séjour de quatre jours à l'obscurité entraîne la perte complète de la léghémoglobine dans les nodosités de jeunes robiniers qui au préalable évoluaient à la lumière. Celle ne réapparaît pas chez les jeunes robiniers remis à la lumière. Toutefois lorsque ces robiniers sont réinoculés, l'activité nitrogénase réapparaît.

### INTRODUCTION

Le robinier ou faux acacia (*Robinia pseudoacacia*L) appartient à la famille des papilionacées. C'est un arbre originaire d'Amérique du nord (PARDE, 1943) cité par MOIROUD et al., 1981. Il est largement répandu en Afrique du nord. C'est un arbre de taille moyenne et sa longueur varie entre 20 et 30 mètres. Les feuilles sont

composées et caduques. C'est un arbre qui peut coloniser et évoluer sur des sols pauvres. Toutefois, le robinier craint les sols acides (MOIROUD et CAPELLANO, 1982). Le robinier peut contracter une symbiose fixatrice d'azote grâce à une bactérie du genre rhizobium. Celle-ci conduit à la formation de nodosités racinaires siège de la fixation et transformation de l'azote atmosphérique.

## Matériel et méthodes

### A. Matériel

#### II.1. Matériel végétal

Les plants de robiniers sont issus de graines traitées par l'acide sulfurique concentré durant une heure pour lever l'inhibition tégumentaire. Rincées plusieurs fois à l'eau distillée, elles sont déposées dans des boîtes de Pétri sur deux papiers Chardin imbibés d'eau. La germination a lieu à l'obscurité, ensuite les graines germées sont repiquées dans pots percés dans leur fond.

#### II.2. Solution nutritive

##### II.2.1. Solution nutritive de base

Elle dérive de la solution de Hoagland, (HEWITT, 1966) avec remplacement respectif de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  et  $\text{KNO}_3$  par  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

**Éléments majeurs** :  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 2,5 mM ;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  : 1,25 mM ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

: 1,00 mM ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,50 mM

**Le fer** est apporté dans les solutions nutritives sous forme de chélat à la concentration de 36  $\mu\text{M}$  à partir d'une solution mère composée de : complexon III EDTA : 13,3g ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 10g ; KOH (solution normale) : 65 ml et qsp : 1000 ml.

**Les oligo-éléments** :  $\text{H}_3\text{BO}_3$  : 46  $\mu\text{M}$  ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  : 9  $\mu\text{M}$  ;  $\text{ZnCl}_2$  : 0,7  $\mu\text{M}$  ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  : 0,3  $\mu\text{M}$  ;  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,2  $\mu\text{M}$  ;  $\text{Na}_2\text{M}_2\text{O}_4$  : 0,1  $\mu\text{M}$ .

**Le pH** est ajusté à 6,2 avec une solution KOH 1M

##### II.2.2. Solutions nutritives azotées

Les solutions nutritives azotées sont obtenues en ajoutant à la solution de base le  $\text{NaNO}_3$  : 2 mM et 4 mM ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  : 4 mM ;  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  : 2 mM.

#### II.3. Infection

Les robiniers sont infectés par des nodosités récoltées des arbres de la nature. L'infection consiste à

appliquer 2 ml d'une solution de broyat nodulaire (4g de MF/100 ml d'eau distillée) sur les racines des jeunes robiniers.

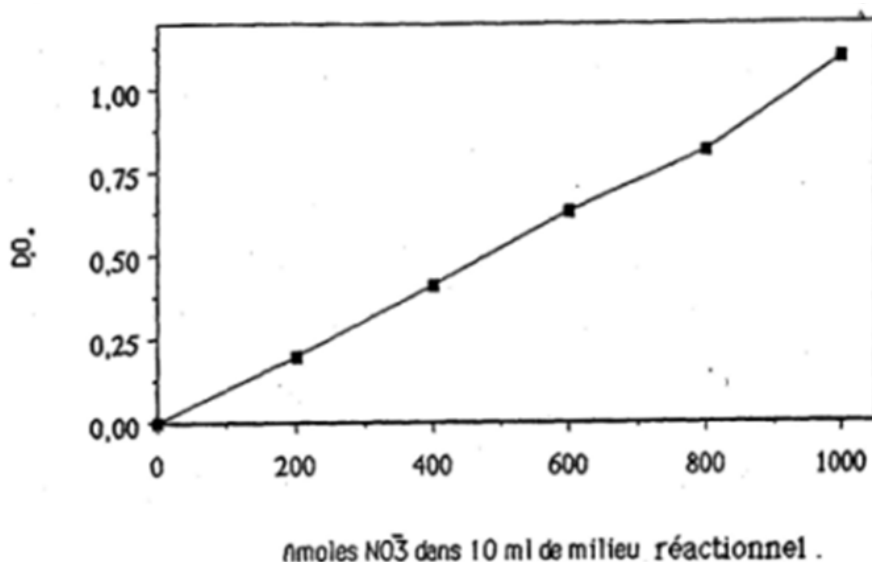
### B. méthodes

#### II.3. Mesure de l'activité nitratre réductase *in vivo*

Elle catalyse la réaction :  $\text{NO}_3^- + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD(P)} + \text{H}_2\text{O}$

Elle est mesurée selon la méthode *in vivo* décrite par PIZELLE et THIERY (1974) modifiée par l'utilisation dans le milieu d'incubation du nitrate ( $\text{KNO}_3$ ) à une concentration de 5 mM au lieu de 20 mM. La quantité de nitrite formée est déterminée par comparaison avec la courbe étalon (Figure 1).

Au cours de ce travail, elle sera exprimée sous l'abréviation ANR.



**Figure 1 :**  
Courbe d'étalonnage pour  
le dosage du nitrite formé

L'activité nitrate réductase est exprimée en nmoles  $\text{NO}_2^-/\text{mg}$  (MS)/h

#### II.4. Mesure de l'activité nitrogénase

L'activité nitrogénase est mesurée par la méthode (STEWART et al., 1967 ; HARDY et al., 1968). Au cours de ce travail, elle sera

exprimée sous l'abréviation ARA. L'activité nitrogénase est exprimée en nmoles d'éthylène formé/h/plante.

### III. Résultats et discussion

#### III.1. Effet de l'alimentation azotée non symbiotique sur de jeunes robiniers

Dans les conditions naturelles, le

robinier peut subvenir à ses besoins azotés en assimilant l'azote du sol. Ainsi cet essai met en évidence l'ANR foliaire, en l'occurrence l'utilisation de l'azote par le robinier tel que l'azote ammoniacal, uréique ou nitrique à différentes concentrations (Tableau I).

**Tableau I :** Variation de l'ANR foliaire en fonction de la source d'azote chez des robiniers non inoculés et âgés de 1 mois et ½

Traitements	Sol. de base sans azote	Sol. de base + $\text{NaNO}_3$ : 2 mM	Sol. de base + $\text{NaNO}_3$ : 4 mM	Sol. de base + $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 4mM	Sol. de base + urée : 2 mM
ANR	4,1±1,6	16,4±6,9	20,4±5,7	5,8±3,5	7,2±3,3

Bien que l'ammonium apparaisse comme un aliment azoté plus intéressant, cependant c'est le nitrate qui est considéré comme l'azote de choix pour la plante.

L'analyse statistique (analyse de la variance) montre que l'activité NR foliaire in vivo ne diffère pas significativement chez les robiniers âgés de 1 mois et ½ alimentés par une solution de base, additionnée en

azote ammoniacal ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  4mM) ou uréique (2 mM). Seule l'alimentation nitrique ( $\text{NaNO}_3$  à deux concentrations : 2 et 4 mM) augmente significativement l'ANR foliaire in vivo.

Dans ces conditions d'évolution de jeunes robiniers, nous dirons que cette activité enzymatique (ANR) est inductible (car elle augmente) en présence de nitrate, en l'occurrence

ce sera son substrat.

Toutefois, cette activité enzymatique peut être constitutive. En l'absence de nitrate, la NR foliaire montre des teneurs appréciables. Ce résultat a été observé chez de jeunes robiniers non inoculés et alimentés par une solution de base sans azote (Tableau II).

**Tableau II :** Evolution de l'activité NR foliaire in vivo chez des robiniers âgés de 1 mois et ½

Temps (jours)	Temps initial ( $T_0$ )	$T_0+13j$	$T_0+18j$	$T_0+28j$
ANR nmoles $\text{NO}_2^-/\text{h}/\text{mg}$ (MS)	9,9±3,0	7,0±2,3	9,5±1,8	9,6±4,7

Au cours de ce travail, nous avons remarqué que l'ANR est appréciable chez de jeunes robiniers non alimentés en nitrate. Il nous a paru intéressant d'inoculer ces jeunes

plants de robiniers et de suivre l'ARA et l'ANR.

#### II.2. Relation entre l'ANR et l'ARA

Nous avons mesuré l'ANR et l'ARA. Nous avons remarqué qu'au fur et à mesure qu'apparaît l'ARA, l'ANR diminue jusqu'à atteindre de faibles valeurs (Figure 2).

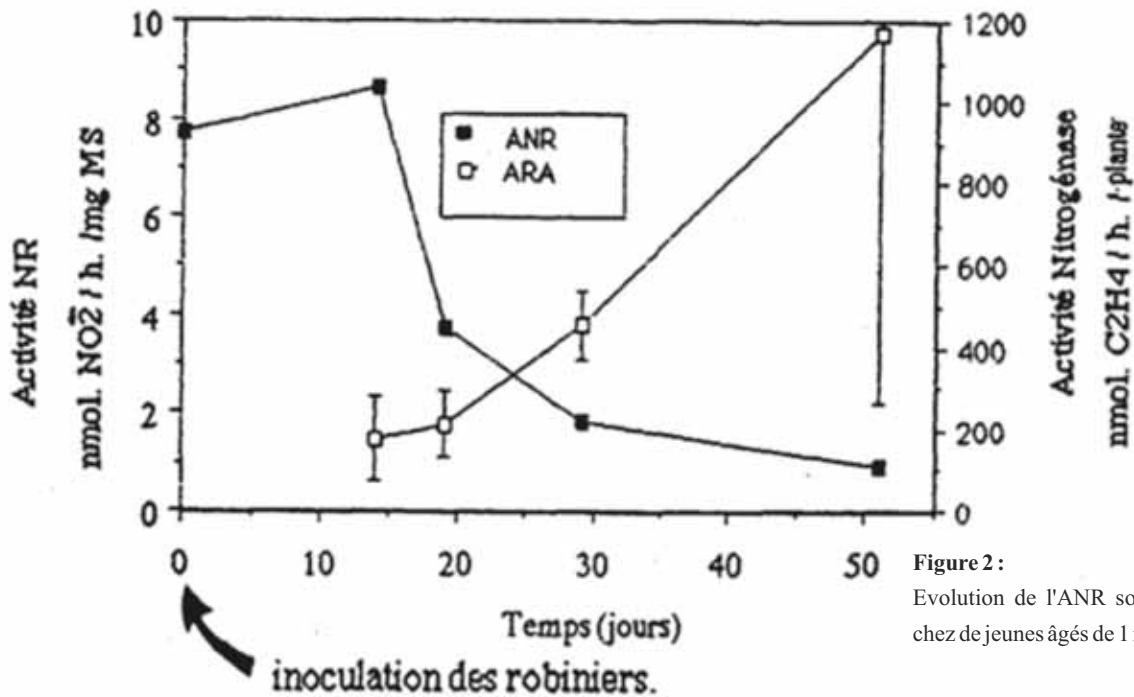


Figure 2 : Evolution de l'ANR sous l'effet de l'ARA chez de jeunes âgés de 1 mois et 1/2

Nous avons remarqué aussi qu'avec l'apparition et l'augmentation de l'ARA, les plantes verdissent et poussent mieux.

Ainsi, ce résultat montre qu'il existe une relation inverse entre ces deux activités enzymatiques.

### III.3. Alimentation azotée symbiotique

#### III.4. Inoculation

Les plantules de robiniers âgés de 1

mois et 1/2 sont inoculés par un broyat de nodosités. Les robiniers présentent des nodosités 15 jours après inoculation. Après apparition des nodosités et leur évolution, nous avons remarqué que leurs tailles et formes étaient différentes. Ainsi nous avons réalisé des coupes longitudinales dans les nodosités et nous avons observé que (Figure 3) :

· Les nodosités jeunes sont de formes sphériques (a) et sont

composées par une seule partie. Tous les tissus internes sont colorés en rouge par la légghémoglobine.

· D'autres plus âgées sont constituées par 2 (b) parties qui sont colorées entièrement par la légghémoglobine, ou encore par 3 parties (c) dont seulement deux parties les plus distales, éloignées de la racine sont colorées par la légghémoglobine.

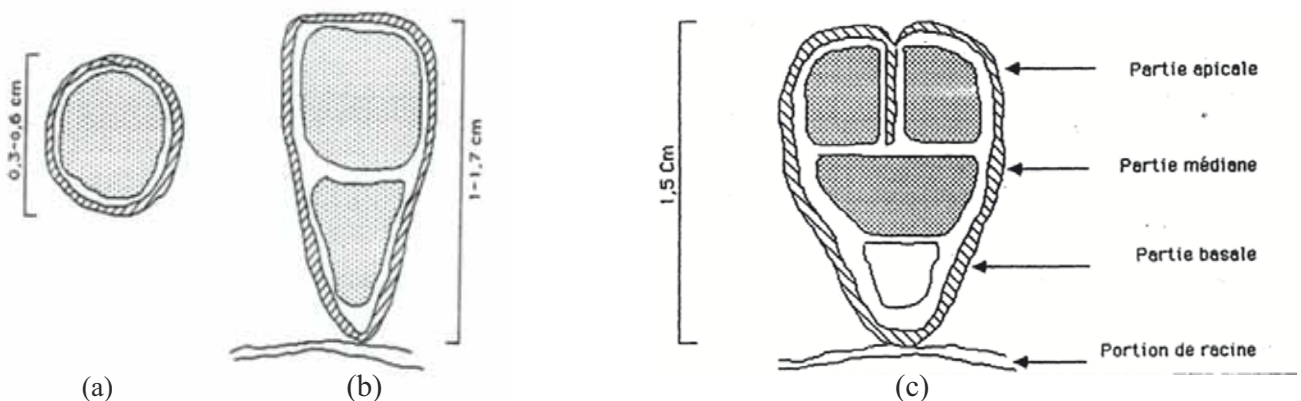


Figure 3 : compartimentation des nodosités de robiniers

Quatre mois après cette inoculation, les nodosités sont réparties dans la partie supérieure du système racinaire (Figure 4).



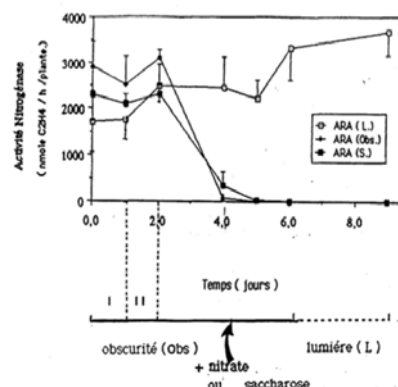
**Figure 4:** Répartition des nodosités dans le système racinaire des robiniers âgés de 6 mois

Au fur et à mesure de la croissance des robiniers les nodosités évoluent, leurs tailles et formes sont très variées (Figure 5). Fréquemment, ces nodosités présentent des ramifications et des constrictions (MOIDOU et CAPELLANO, 1981).



**Figure 5:** Morphologie des nodosités chez des robiniers âgés de 6 mois et 1/2

### III.5. Effet de la lumière sur l'ARA

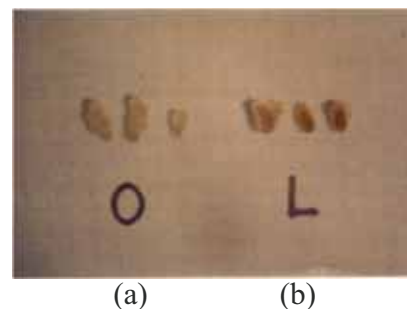


**Figure 6:** Variation de l'activité nitrogénase sous les effets de l'obscurité et de la lumière

La figure 6 montre que les activités nitrogénases ont été mesurées chez des robiniers exposés à la lumière. Elles sont appréciables. Après leur exposition à l'obscurité durant 48 heures, cette activité enzymatique reste appréciable. Toutefois, après 4 jours à l'obscurité, l'activité nitrogénase diminue pour atteindre une valeur nulle en comparaison avec les robiniers témoins exposés à la lumière. Nous avons ajouté le saccharose à une concentration de 2 mM et nous avons suivi l'évolution de l'activité nitrogénase. Selon Burley 1981 le saccharose (2 mM) est la forme principale de carbone chez le Soja et sa concentration dans les nodosités est corrélée avec la nitrogénase (CHING *et al.*, 1975).

Ainsi aucun traitement : le saccharose ou la lumière ne parvient à faire réapparaître l'activité nitrogénase qui reste nulle.

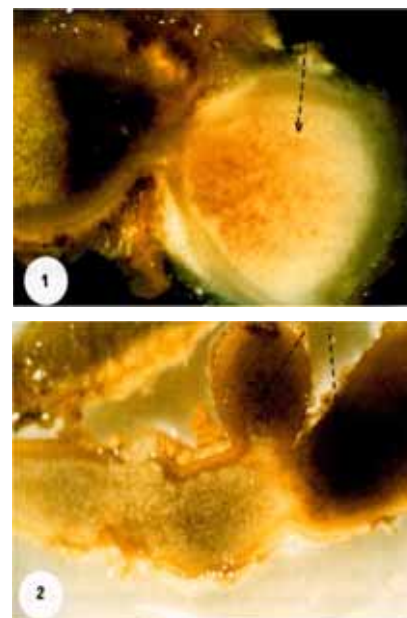
Nous avons réalisé des coupes longitudinales dans les nodosités de robiniers exposés à l'obscurité (a) et ceux exposés à la lumière (b) (Figure 7).



**Figure 7:** Coupes longitudinales dans les nodosités de robiniers exposés à l'obscurité et à la lumière

Nous remarquons que les tissus internes des nodosités sont colorés différemment : celles qui sont exposées à la lumière sont colorées en rouge par la léghémoglobine mais celles qui sont exposées à l'obscurité présentent une coloration verte.

Après disparition de l'activité nitrogénase, nous avons réinoculé ou non ces plants que nous remis à la lumière. Nous avons suivi l'évolution des nodosités en coupes longitudinales (Figure 8).



**Figure 8:** Nodosités en coupe longitudinale chez des robiniers exposés à l'obscurité puis remis à la lumière

## 1 : après réinoculation

- Partie verte : elle concerne la première inoculation
- Partie rouge : elle concerne la réinoculation

Ainsi, nous observons la formation nouvelle de couleur rouge sur le lobe apical de couleur verte de l'ancienne nodosité formée.

## 2 : non réinoculés

Nous n'avons remarqué aucun changement de couleur : les tissus de la nodosité restent de couleur verte.

## Conclusion

Le nitrate libéré par la minéralisation active de la litière constitue l'une des sources de la nutrition azotée du robinier, d'où l'intérêt d'étudier la première étape de l'assimilation de l'azote nitrique par la nitrate réductase et l'azote moléculaire par la nitrogénase.

La nitrate réductase est une enzyme qui peut être synthétisée en absence de son substrat : le nitrate, elle est donc constitutive comme dans les cellules de tabac (HEIMER et RIKLIS, 1979).

Chez le jeune robinier la nitrate réductase est constitutive, fonctionnelle pour permettre au jeune plant d'évoluer. Néanmoins celle-ci est vite relayée dès que le plant est infecté par le rhizobium. Ainsi, la nitrogénase prend le relais dans la nutrition azotée du robinier.

Les robiniers soumis à l'obscurité perdent définitivement la faculté de fixer l'azote atmosphérique car les bactéries ne sont plus efficaces. Le saccharose exogène ne peut pas remplacer les sucres que la plante fournit à la bactérie.

## Références bibliographiques

Ching T.m., Hedtke S., Russel S.a. Et Evans H.j., 1975.- Energy state and dinitrogen fixation in soybean nodules of dark-grown plants. *Plant. Physiol.*, 55, 796-798.

Hardy R.w.f., Holsten R.d., Jackson E.k. Et Burns R.c., 1968.- The acetylene –ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant. Physiol.* 43, 1185-1207.

Heimer Y.m. Et Riklis E., 1979.- Post transcriptional control of nitrate reductase of cultured Tobacco cells by amino acids. *Plant. Physiol.*, 64, 663-664;

Hewitt E.j., 1966.- Sand and water culture methods in the study of plant nutrition. Commonwealth Agricultural Bureaux Bucks. 547 p.

Moiroud A. Et Capellano A., 1981.- Fixation d'azote chez les espèces ligneuses symbiotiques. II : Reprise de l'activité fixatrice (réduction de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) chez *Robinia pseudoacacia* L. au printemps. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 128, 239-244.

Moiroud A., Capellano A. Et Bärtschi H., 1981, 1981.- Fixation d'azote chez les espèces ligneuses symbiotiques. I : Ultrastructure des nodules, mycorhizes à vésicules et à arbuscules et activité réductrice de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> de jeunes plants de *Robinia pseudoacacia* cultivés au laboratoire. *Cana. J. Bot.*, 59, 481-490.

Pizelle G. Et Thiery G., 1974.- Réduction des nitrates dans les feuilles, les racines et les nodules d'Aunes glutineux (*Alnus glutinosa* L. Gaertn). *C. R. Acad. Sci. Paris, D*, 279, 1537-1537.

Stewart W.d.p., Fitzgerald G. P. Et Burris R.H., 1967., 1967.- In situ

studies on N<sub>2</sub> fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 58, 2071-2078.