

## Influence de la fertilisation azotée sur l'activité nitrate réductase et sur les teneurs en nitrates des feuilles et racines principales de la betterave à sucre (*Beta vulgaris* Var. Maghribel)

Fatima NAMAN <sup>1</sup>, Driss ZAOUI <sup>1</sup>✧, Abdelaziz OUAAGA <sup>2</sup> & Abdelali CHRAÏBI <sup>1</sup>

(Reçu le 24 /02/1995 ; Accepté le 05/12/ 1995)

تأثير التخصيب الأزوتي على نشاط النترات ردوكتاز و على كميات النترات الموجودة بأوراق و جذور  
الشمندر السكري (*Beta vulgaris*) نوع Maghribel

قد قيس نشاط النترات ردوكتاز في الأوراق و الجذور الأساسية للشمندر السكري المزروع في الحقل. نشاط هذا الأنزيم دائما مرتفع في الأنسجة الشابة سواء في الجذر أو الورق. و يتمركز نشاطه باليمبوس بينما نبته الشمندر السكري تكبر وتنمو، فنشاط النترات ردوكتاز ينقص في جميع الأعضاء و بالذات في الجذر الأساسي لكي يصبح منعدها بعد 140 يوما من الزرع. وتطور نشاط هذا الأنزيم يتبع تطور كميات النترات بجميع أعضاء الشمندر السكري. وقد أثر الأزوت بشكل واضح على النترات ردوكتاز و على كميات النترات.

الكلمات المفتاحية : النترات ردوكتاز - الأوراق - الجذر - الشمندر السكري - النترات - الأزوت.

### Influence de la fertilisation azotée sur l'activité nitrate réductase et sur les teneurs en nitrates des feuilles et racines principales de la betterave à sucre (*Beta vulgaris* Var. Maghribel)

L'activité nitrate réductase (ANR) a été mesurée dans les feuilles (limbes et pétioles) et dans les racines pivotantes (partie sous le collet, partie médiane et pointe de la racine principale) de la betterave à sucre cultivée en plein champ. L'ANR est toujours élevée dans les jeunes tissus racinaires ou foliaires. Elle se localise surtout au niveau du limbe. Au fur et à mesure que la plante se développe, l'ANR diminue dans les différents organes et surtout dans la racine; elle diminue au cours de la tubérisation pour s'annuler vers le 140<sup>ème</sup> jour après semis. L'évolution de cette ANR suit celle des teneurs en nitrates des différents organes. L'effet de l'azote sur l'ANR et sur les teneurs en nitrates est très hautement significatif.

**Mots clés:** Nitrate réductase - Feuilles - Racine principale - Betterave à sucre - *Beta vulgaris* - Nitrate - Azote

### Effect of nitrogen fertilization on nitrate reductase activity and nitrates contents of main leaves and roots of sugar beet (*Beta vulgaris* var. Maghribel)

Nitrate reductase activity (NRA) was measured in leaves (petiol and blade) and roots produced by sugar beet (*Beta vulgaris* Var. Maghribel) growing in the field. NRA was always higher in young tissues. This activity was particularly localized in leaf blade. The activity decreased as the root became tuberous and not promote any detectable activity at day 140 after sowing. Variations in nitrate reductase activity in relation to nitrate were parallel. The quantitative effect of nitrogen on NRA and nitrate contents was significant.

**Key words:** Nitrate reductase - Leaves - Roots - Sugar beet - *Beta vulgaris* - Nitrate - Nitrogen

<sup>1</sup> Université Abou Chouaïb Doukkali, Département de Biologie, Faculté des Sciences, B.P. 20, El Jadida, Maroc

<sup>2</sup> ORMVAD, Service de Production Végétale B.P. 58, El Jadida, Maroc

✧ Auteur correspondant

## INTRODUCTION

L'étude du métabolisme azoté des végétaux supérieurs a montré que le nitrate peut, selon les espèces, être réduit soit dans les racines, soit dans les feuilles (Touraine, 1985). La localisation de l'assimilation du nitrate joue un rôle essentiel dans la physiologie de la plante. Ainsi, chez la plupart des végétaux supérieurs de type herbacé, la réduction du nitrate s'effectue essentiellement dans les feuilles (Touraine, 1985). Chez les légumineuses, la réduction de nitrate est plutôt racinaire, chez la fève et le pois, essentiellement foliaire chez le haricot et le soja (Sprent & Thomas, 1984). Pour les céréales, les nitrates sont réduits en partie dans les racines et en partie dans les organes aériens et particulièrement les feuilles métaboliquement actives (Robin *et al.*, 1979). L'enzyme qui catalyse la première étape de cette réduction est la nitrate réductase (Touraine, 1985; Habib, 1984; Jonas *et al.*, 1992) qui peut utiliser le NADH ou le NADPH comme donneur d'électrons (Guerrero *et al.*, 1981; Hewitt, 1975).

La régulation de l'activité nitrate réductase (ANR) dans différents tissus a fait l'objet de nombreux travaux (Chu *et al.*, 1990; Dorchie & Rambour 1985; Hewitt & Cutting, 1979).

Ce travail traite la variation de l'activité nitrate réductase et les teneurs en nitrate dans tous les organes de la betterave à sucre (limbe, pétiole, collet et racine pivotante) au cours du temps (cycle de la culture) et en fonction des doses croissantes d'azote apportées à la culture.

## MATÉRIEL & MÉTHODES

Un essai expérimental a été installé en 1993/1994 sur des parcelles de la Station Expérimentale de Mise en Valeur Agricole (S.E.M.V.A.) des Zemamra dans la région des Doukkala. Avant l'installation de la culture, on a effectué des prélèvements du sol pour le caractériser via les paramètres figurant dans les tableaux 1 et 2.

La betterave à sucre *Beta vulgaris* variété Maghribel est cultivée sur un sol de texture argilo-sableuse (Tirs) et présentant une capacité de rétention d'eau élevée. Ces plantes ont reçu deux formes d'engrais azotés: le sulfate d'ammonium 21% et l'urée 46% à raison de 100, 250 et 400 unités par hectare (kg/ha). Ces doses ont été apportées en trois fractions, avec un témoin (plante ne recevant pas d'azote) et ont reçu aussi 300 unités/ha de

sulfate de potassium 48% et 150 unités/ha de supertriple-phosphate 45%. Le semis est réalisé à plat (22 décembre 1993). Le dispositif adopté pour l'installation de la culture est de type "bloc aléatoire complet" avec quatre répétitions. Le mode d'irrigation pratiqué est le système aspersion, cette irrigation vise à assurer des conditions hydriques optimales tenant compte du régime pluviométrique qui est insuffisant.

**Tableau 1. Caractéristiques physiques**

Mesure	Couche *0 - 20 cm*	Couche *20 - 40 cm*
Granulométrie		
• Argile (%)	38,20	39,70
• Limon (%)	13,70	11,50
• Sable (%)	48,10	48,80
Densité apparente	1,4	1,5
Humidité		
HCC (%)	23	23
HPF (%)	13	13

**Tableau 2. Caractéristiques chimiques**

Analyse	Résultat de	Teneur *	Interprétation				
			T.F.	F.	-F.	B.	E.
pH	7,9	6,5	**	**	**	**	**
Mat.org	1,7 %	3,0 %	**	**			
C.E.C	32,4 méq	15,0 méq	**	**	**	**	**
Phosphore	11 ppm	26 ppm	**	**	**	**	**
Potassium	187 ppm	181 ppm	**	**	**	**	**
Calcium	5003 ppm	1600 ppm	**	**	**	**	**
Soufre	34 ppm	10 ppm	**	**	**	**	**
Magnésium	515 ppm	100 ppm	**	**	**	**	**
Manganèse	130 ppm	230 ppm	**	**			
Bore	0,9 ppm	1,6 ppm	**	**			
Cuivre	2,6 ppm	2,1 ppm	**	**	**	**	**
Molybdène	0,2 ppm	0,2 ppm	**	**	**	**	**
Fer	183 ppm	100 ppm	**	**	**	**	**
Zinc	5,3 ppm	2,5 ppm	**	**	**	**	**

\* Teneur souhaitable/besoins de la betterave; T.F.: très faible; F.: faible; -F.: un peu faible; B.: bonne; E.: élevée

Des placettes, d'un mètre carré contenant 7 à 11 plantes, ont été prélevées aléatoirement dans chaque parcelle élémentaire au cours du cycle de la betterave à sucre avec une fréquence moyenne de 15 jours.

Les mesures de l'ANR et des teneurs en nitrates sont réalisées sur un échantillon de trois plantes choisies au hasard. Ces mesures sont faites sur les limbes, pétioles de feuilles moyennes, collets, partie sous le collet, partie médiane et sur la partie génératrice de la racine principale de la betterave à sucre durant tout le cycle végétatif de la plante (première année de végétation).

Les mesures de l'activité nitrate réductase *in vivo* et *in vitro* sont basées sur la production de  $\text{NO}_2^-$  à partir de la réduction des nitrates. Cette dernière méthode est utilisée pour s'assurer de l'absence ou non d'une ANR au niveau de la partie sous le collet et la partie médiane de la racine principale.

Les plantes ont été prélevées, soigneusement lavées, puis placées dans des sachets en plastique et transportées, au laboratoire, dans une glacière.

Le principe de la mesure de l'activité de réduction du nitrate *in vivo* consiste à doser le nitrite formé après la réduction du nitrate par des fragments de tissu de betterave à sucre (racine, collet, limbe et pétiole) incubés dans des conditions d'anaérobiose, selon le procédé de Ferrari & Varner (1971) et de Jaworski (1971).

Environ 0,2 g de tissu frais est mis à incuber dans 5 ml d'un mélange constitué de tampon phosphate potassique 0,1 M (pH 7,5), de  $\text{KNO}_3$  à 20 mM. Après avoir dégazé le tube pendant 3 minutes, celui-ci est bouché et placé dans un bain-marie thermostaté à 28°C et à l'obscurité. Après 30 minutes, le nitrite formé est révélé par l'addition de 1 ml de sulfanylamide à 0,2% dans une solution aqueuse d'HCl 3 N et de 1 ml de chlorhydrate de N-(1 naphthyl-éthylène) diamine en solution aqueuse à 0,15%. En présence de nitrite, il apparaît une coloration rose dont l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 540 nm. La quantité de nitrite est ensuite calculée à partir d'une gamme étalon de  $\text{NaNO}_2$  établie de 0,01 à 0,10  $\mu\text{mole}$  de  $\text{NaNO}_2$ . L'activité enzymatique est exprimée en  $\mu\text{moles}$  de  $\text{NO}_2^-$  formé par heure et par gramme de matière fraîche ( $\mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  MF).

La mesure des activités enzymatiques *in vitro* d'après la méthode de Robin modifié (1979) nécessite la préparation d'un extrait effectué à partir de tissus frais. Les fragments de racines principales sont broyés dans un mortier en présence de l'azote liquide, puis repris dans un tampon phosphate :

- Tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1M, pH = 7.5
- EDTA : 30 mM
- Polyclar AT : 5%

Le broyat est ensuite centrifugé pendant 30 minutes à 13 000 g. Après homogénéisation, le tout est filtré sur gaze ; le filtrat constitue l'extrait enzymatique brut. Toutes ces opérations d'extraction enzymatique sont effectuées à une

température voisine de 4°C. L'activité nitrate réductase est mesurée en utilisant comme donneur d'électrons le NADH. 100  $\mu\text{l}$  d'extrait enzymatique brut sont ajoutés au milieu d'incubation suivant:

- 1 ml du tampon d'extraction 0,1 M; pH = 7,5
- 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{KNO}_3$  0,1M
- 140  $\mu\text{l}$  de NADH 1mM.

L'incubation est réalisée à l'obscurité dans un bain-marie thermostaté à 28°C pendant 1 heure ; la réaction enzymatique est stoppée par les réactifs de diazotation des nitrites. La lecture de l'absorbance est faite à 540 nm, les activités sont exprimées en  $\mu\text{mole}$  de nitrite formé par heure et par gramme de matière fraîche.

Pour le dosage des nitrates la méthode utilisée est celle de Rodier (1971), qui consiste en une solubilisation des nitrates à partir de la poudre végétale obtenue. Une prise d'essai de 100 milligrammes de poudre est mise dans une fiole avec 20 ml d'eau distillée, fermée et portée au bain-marie thermostaté à 45°C pendant 1 heure. Après centrifugation de 15 minutes à 13000 g, le surnageant est retenu pour le dosage des nitrates. À 50  $\mu\text{l}$  de solution de  $\text{NO}_3^-$  ou de surnageant, sont ajoutés 200  $\mu\text{l}$  de SSA (acide sulfosalicylique à 5% d'acide sulfurique concentré). Après 20 minutes à température ambiante, on ajoute 4,75 ml de NaOH (2N). On procède alors à la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 410 nm (coloration jaune stable pendant 48 heures). Les concentrations en nitrates sont calculées à partir d'une gamme étalon de  $\text{KNO}_3$  à 0,01M.

Pour traiter les résultats, on a utilisé le logiciel "STATITCF". Pour la comparaison des moyennes, on a utilisé la méthode de Newman & Keuls, tout en se fixant un seuil de probabilité de 5% pour l'acceptation ou le rejet de l'hypothèse d'égalité des moyennes.

## RÉSULTATS & DISCUSSION

### 1. Mesure de l'activité nitrate réductase dans les racines principales et dans les feuilles

Afin de comparer l'ANR dans différents organes de la betterave à sucre, on a utilisé des plantes ayant reçu une dose d'azote de 250 kg/ha (Naman *et al.*, 1994). Cette dose d'azote considérée comme dose optimale est prise en compte tout au long du cycle de la betterave à sucre (première année de végétation).

La figure 1 représente l'activité nitrate réductase au niveau de la partie aérienne de la plante (limbe,

pétiole et collet) au cours du cycle de la culture. L'ANR atteint un maximum vers le 79ème jour après semis, qui est de l'ordre de  $0,75 \mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de MF au niveau du limbe et de  $0,30 \mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de MF au niveau du pétiole. Cette activité reste supérieure au niveau du limbe par rapport au pétiole. Au-delà de cette période, il y a une chute de l'activité. Par contre, au niveau du collet, l'ANR reste toujours inférieure à celles du limbe et du pétiole et diminue dès le 46ème jour après semis et ceci tout au long du cycle de la culture.

ANR ( $\mu\text{mole NO}_2^-/\text{h} \cdot \text{g}$  de MF)

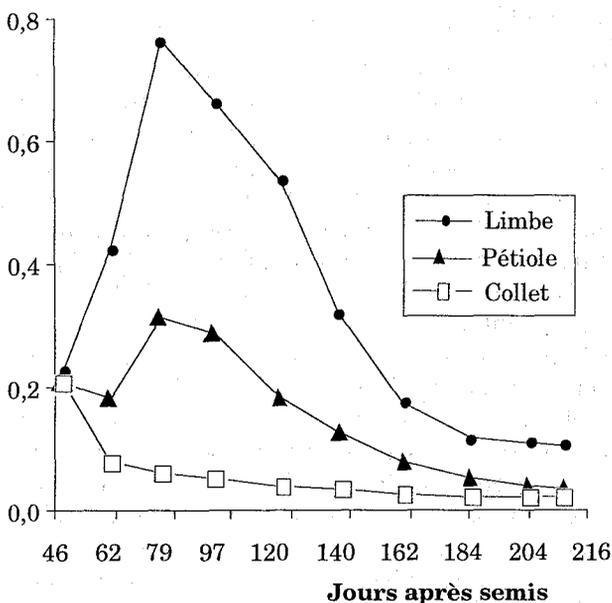


Figure 1. Évolution de l'activité nitratre réductase au niveau de la partie aérienne au cours du cycle de la culture

Dans les feuilles vertes, du début du cycle jusqu'au 105ème jour après semis, l'ANR est globalement équivalente dans les feuilles jeunes et dans les feuilles âgées. La différence ne devient significative que vers la fin du cycle (Tableau 3).

Tableau 3. Activité Nitratre Réductase (ANR) au niveau des feuilles jeunes et âgées de la betterave à sucre, exprimée en  $\mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de matière fraîche

Organe végétal	Activité nitratre réductase	
	au début du cycle 105 j.a.s	à la fin du cycle 163 j.a.s
Feuilles âgées	$0,692 \pm 0,034$	$0,087 \pm 0,005$
Feuilles jeunes	$0,703 \pm 0,048$	$0,130 \pm 0,066$

Les résultats de l'activité enzymatique sont exprimés par la moyenne et l'intervalle de confiance et calculés au risque de 5% ( $n=6$ ) j.a.s: Jour après semis

Ainsi, Nevins & Loomis (1970) ont précisé que la faible réduction de nitratre dans les feuilles adultes représente un mécanisme d'adaptation en vue de développement de jeunes tissus.

La figure 2 montre que, dans les racines pivotantes et ceci à partir du 46ème jour après semis, l'ANR est de l'ordre de  $0,087 \mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de MF pour la partie sous le collet ( $R_1$ ), de  $0,081$  pour la partie médiane ( $R_2$ ) et de  $0,099$  pour la pointe de la racine principale ( $R_3$ ). L'ANR dans la racine pivotante est plus importante dans la pointe par rapport aux autres parties. Cette activité diminue progressivement au cours du cycle de la plante et s'annule à partir du 140ème jour après semis pour la région sous le collet et la partie médiane. Cette activité reste faible dans la pointe de la racine pour atteindre en fin de cycle  $0,042 \mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de MF.

ANR ( $\mu\text{mole NO}_2^-/\text{h} \cdot \text{g}$  de MF)

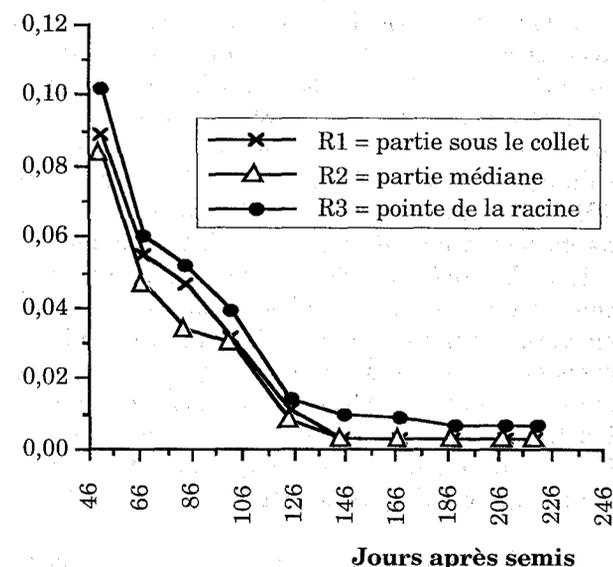


Figure 2. Évolution de l'activité nitratre réductase racinaire au cours du cycle de la culture

Les résultats obtenus montrent que l'ANR est plus importante dans les feuilles par rapport au collet et à la racine principale. Ces résultats concordent avec ceux observés chez le haricot et le soja (Sprenst & Thomas, 1984). Par contre, ils s'opposent à ceux observés chez le pêcher (Bussi *et al.*, 1989) et chez la chicorée de Bruxelles (Dorchies & Rambour, 1985) où l'ANR est plus élevée au niveau racinaire qu'au niveau foliaire.

Par ailleurs, dans les tissus jeunes, l'ANR demeure élevée dans les feuilles et dans les racines. Cette observation rejoint celle de Dorchies & Rambour

(1985) chez la chicorée de Bruxelles et celle de Chu *et al.* (1990) chez le cotonnier. Ceci montre que les tissus jeunes et métaboliquement actifs possèdent la plus grande capacité de réduction du nitrate, pour assurer leur croissance et leur développement.

Dans les racines pivotantes, l'ANR diminue au cours de son développement et, en particulier, lors de leur tubérisation, qui est déjà bien marquée après le stade 16 feuilles (Laby, 1976). Cette ANR s'annule vers le 140ème jour après semis (stade 28 feuilles), mais elle demeure faible dans la pointe de la racine. Cette observation confirme l'hypothèse selon laquelle l'ANR régresse ou disparaît dans un organe qui acquiert une fonction de mise en réserve (Dorchies & Rambour, 1985; Dorchies & Rambour, 1983). La diminution de l'ANR dans la racine principale de la betterave à sucre suit la croissance de celle-ci et, par conséquent, accumule le saccharose (Tableau 4).

**Tableau 4. Évolution de l'activité nitrate réductase en fonction de la teneur en saccharose et en fonction du cycle de la betterave à sucre**

J.a.s	46	62	79	97	120	140	162	184	204	216
ANR	0,08	0,04	0,03	0,02	0,005	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S(%)	-	-	-11,07	12,02	12,89	13,61	15,39	16,64	17,46	

ANR : Activité Nitrate Réductase, exprimée en  $\mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de matière fraîche; S : Teneur en sucre en % de matière fraîche de la racine principale

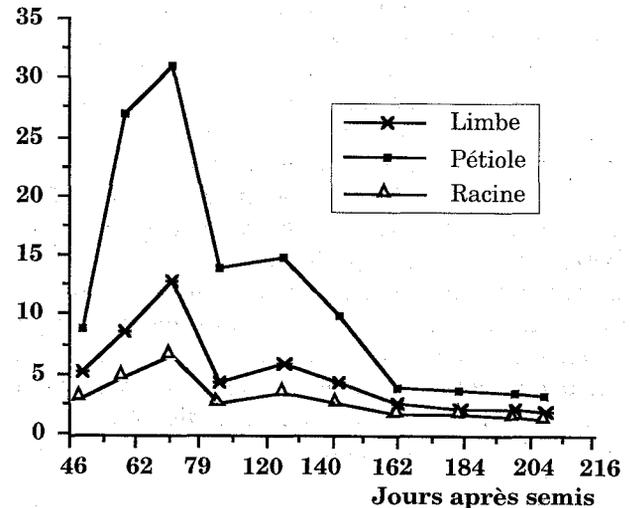
Laby (1985) a précisé que le saccharose n'est pas réparti uniformément dans la racine de la betterave à sucre. Ainsi, la partie sous le collet et la partie médiane de la racine, où a eu lieu notre échantillonnage, sont les plus riches en saccharose comparativement à la pointe de la racine.

À partir du 140ème jour après semis, la mesure par les méthodes *in vivo* et *in vitro* n'ont pas permis de déceler une ANR au niveau de la partie sous le collet et la partie centrale de la racine principale de la betterave à sucre. Ceci peut être expliqué par l'apparition d'une activité de mise en réserve dans un organe de stockage, qui inhiberait l'expression de l'ANR, soit par modification de l'utilisation du potentiel énergétique ou soit par la conversion des hydrates de carbone en saccharose qui modifierait la teneur en nucléotides réduits qui sont indispensables à la nitrate réductase.

La croissance de la racine chez la betterave à sucre devient exponentielle à partir du stade 6 feuilles (Fleury & Caneill, 1983). Ces auteurs ont montré qu'il y a un changement dans le rapport poids sec des racines/poids sec des feuilles, correspondant

dans notre cas au stade 28 feuilles (Figure 3). Ceci peut être expliqué par le passage des produits de la photosynthèse des feuilles vers la racine principale. Par contre, la tubérisation s'accroît rapidement à partir du stade 16 feuilles et ceci par la formation dans la racine de nombreux anneaux de cambium concentriques de faisceaux libéro-ligneux, qui sont insérés dans le parenchyme des cellules saccharifères destinées au stockage du saccharose (Laby, 1976).

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/g de MF)**



**Figure 3. Évolution des teneurs en nitrates des différents organes de la culture au cours du temps**

L'analyse statistique des résultats de l'ANR racinaire montre qu'il n'y a pas de différences significatives dans la répartition de l'ANR entre la périphérie et la partie centrale de la racine principale. Les différences sont très hautement significatives entre le collet (C), la partie sous le collet (R<sub>1</sub>), la partie médiane (R<sub>2</sub>) et la pointe (R<sub>3</sub>) de la racine principale (Tableau 5).

**Tableau 5. Activité nitrate réductase au niveau des différentes parties de la racine principale (exprimée en  $\mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de matière fraîche)**

Organes	Stades de développement				
	46 j.a.s. 5 feuilles	62 j.a.s. 8 feuilles	97 j.a.s. 16 feuilles	120 j.a.s. 23 feuilles	140 j.a.s. feuilles
C	0,194 a	0,062 a	0,037 a	0,025 a	0,021
R1	0,087 c	0,052 c	0,028 b	0,008 c	0,000
R2	0,081 d	0,043 d	0,027 c	0,005 d	0,000
R3	0,099 b	0,057 b	0,035 a	0,011 b	0,007

C = Collet; R1 = Partie sous le collet; R2 = Partie médiane de la racine principale; R3 = Pointe de la racine principale  
Les valeurs suivies de la même lettre au sein d'une colonne ne sont pas significativement différentes au niveau de probabilité de 5%

## 2. Teneurs en nitrates des différents organes de la betterave à sucre

L'évolution de la teneur en nitrate des limbes, pétioles et racines est illustrée par les figures 4, 5 et 6. Les concentrations en nitrates atteignent les valeurs les plus élevées au début de la saison et en particulier au 79ème jour après semis. Les valeurs sont de 12 mg de MS pour les limbes, 30mg de MS pour les pétioles, 5,64 mg de MS pour les racines principales. Au-delà de cette date, on assiste à une chute rapide de la teneur en  $\text{NO}_3^-$  dans tous les organes de la betterave à sucre. D'autre part, les teneurs restent élevées dans les pétioles comparativement au limbe et aux racines principales. La concentration 1 mg/g de MS dans les pétioles constitue une concentration critique au dessous de laquelle la betterave à sucre est considérée déficiente en azote (Ulrich *et al.*, 1959 ; Ulrich & Hills, 1973). On a observé que les betteraves ayant reçu les doses faibles d'azote atteignent cette concentration critique plus tôt que celles ayant reçu des doses plus élevées. Ceci illustre que la connaissance de la teneur en nitrates dans le pétiole à un moment donné du cycle de la culture constituerait un bon indicateur de la disponibilité d'azote dans le sol.

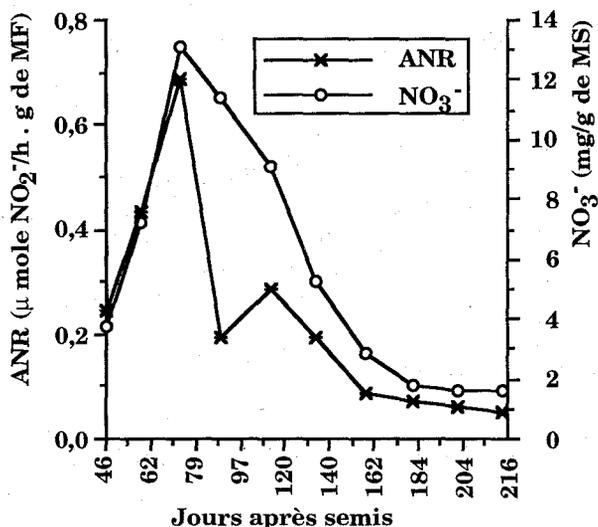


Figure 4. Comparaison entre ANR et teneurs en nitrates au niveau du limbe au cours du cycle de la culture

## 3. Teneurs en nitrate et ANR dans les feuilles et les racines principales

Les figures 4, 5 et 6 permettent aussi de comparer les courbes représentatives de l'ANR à celles de la teneur en nitrate dans les feuilles et dans les racines principales. Dans les limbes et les pétioles, les courbes des teneurs en nitrates présentent un

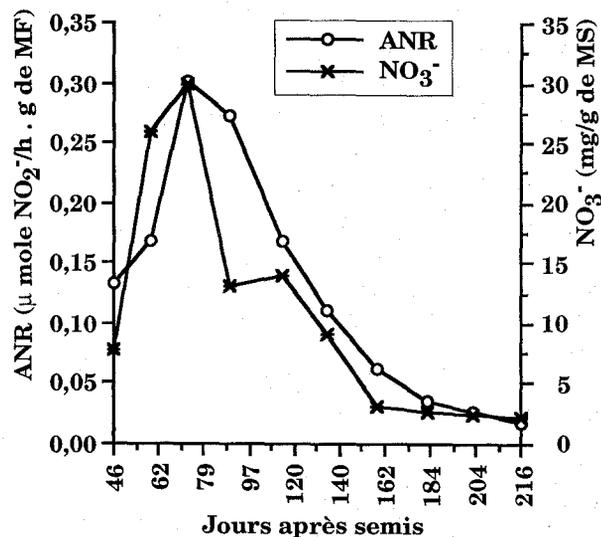


Figure 5. Comparaison entre ANR et teneurs en nitrates au niveau du pétiole au cours du cycle de la culture

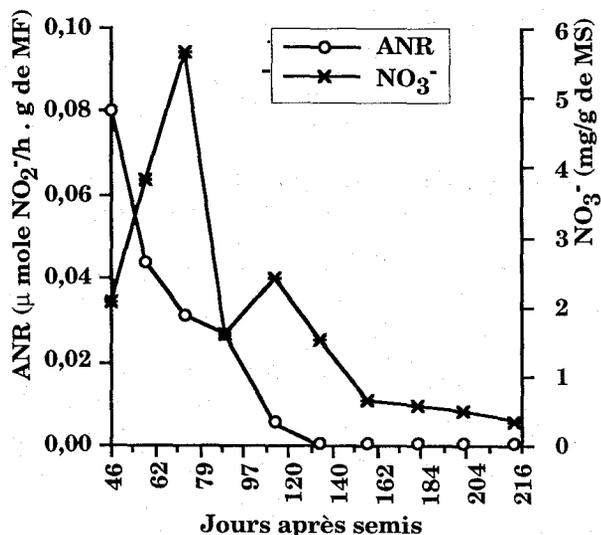


Figure 6. Comparaison entre ANR et teneurs en nitrates au niveau de la racine principale au cours du temps

pic au début du cycle de la plante (79ème jour après semis). En même temps les ANR maximales sont atteintes. L'activité de la nitrate réductase maximale est environ 2,5 fois plus importante dans les limbes ( $0,75 \mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ ) que dans les pétioles ( $0,30 \mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ ) bien que la teneur en nitrate soit 12 mg/g de MS dans les limbes et 30 mg/g de MS dans les pétioles. Les teneurs élevées en nitrate au niveau du pétiole et la faible ANR, contrairement au limbe, semble indiquer que le système réducteur de la nitrate réductase est situé au niveau du limbe. Les pétioles constituent un organe de transition des nitrates vers le lieu de leur réduction qui est le limbe.

Le parallélisme existant entre les teneurs en nitrates et l'ANR au niveau de la partie aérienne montre que l'azote a un effet positif sur l'ANR au cours des phénomènes de croissance et de développement de la betterave à sucre car le nitrate induit la nitrate-réductase pour sa réduction en nitrites (Bussi *et al.*, 1989).

Les engrais de couverture apportés, sous forme d'urée, à la betterave à sucre augmentent les teneurs des nitrates et n'affectent pas l'ANR dans les différents organes de la betterave à sucre. Ce phénomène montre qu'à partir de ce stade, la plante ne bénéficierait pas de l'apport d'azote.

#### 4. Effet d'apport azoté sur l'ANR et teneurs en nitrates des feuilles et racines principales

Les tableaux 6 et 7 montrent l'effet d'apport azoté sur les teneurs en nitrates et l'ANR des différents organes de la betterave à sucre au 79ème jour après semis. On observe une augmentation des teneurs en nitrates et des ANR des différents organes de la betterave à sucre en fonction des doses croissantes d'azote. La fumure azotée a un effet positif et très hautement significatif sur les teneurs en nitrates et, par conséquent, sur les activités de la nitrate réductase qui est inductible par son substrat, le nitrate.

**Tableau 6. Effet de l'azote sur les teneurs en nitrates des différents organes de la betterave à sucre** (exprimées en mg/g de matière sèche)

Organes	Nitrates (mg/g de MS)			
	N0	N100	N250	N400
Limbe	5,60d	6,42c	12,00b	16a
Pétiole	9,61d	22,00c	30,00b	38a
Racine	2,60d	3,31c	5,64b	8a

Les valeurs suivies de la même lettre au sein d'une ligne ne sont pas significativement différentes au niveau de probabilité de 5%.

**Tableau 7. Effet de l'azote sur l'ANR des différents organes de la betterave à sucre** (exprimée en  $\mu\text{mole NO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de matière fraîche)

Organes	ANR ( $\mu\text{mole NO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de MF)			
	N0	N100	N250	N400
Limbe	0,47 d	0,65 c	0,75 b	0,81 a
Pétiole	0,21 d	0,26 c	0,30 b	0,36 a
Collet	0,020d	0,037c	0,046b	0,053a
Racine (R1)	0,015d	0,031c	0,044b	0,051a
Racine (R2)	0,013d	0,029c	0,031b	0,041a
Racine (R3)	0,019d	0,036c	0,049b	0,056a

Les valeurs suivies de la même lettre au sein d'une ligne ne sont pas significativement différentes au niveau de probabilité de 5%.

L'azote a augmenté les teneurs en nitrates et par la suite l'ANR dans tous les organes de la betterave à sucre. En effet, l'azote nitrique absorbé par la plante est réduit par la nitrate réductase en nitrite et puis en ammonium par la nitrite réductase, pour être intégré dans les acides aminés précurseurs d'autres composés tels que les protéines et les acides nucléiques, ce qui donne une bonne croissance et un bon développement de la betterave à sucre. Cette amélioration est surtout marquée pour la dose N250 et N400 g/ha.

#### CONCLUSION

Les résultats obtenus montrent que :

- Dans les tissus jeunes, l'ANR demeure élevée dans les feuilles et dans les racines. Elle est importante surtout au niveau du limbe. L'ANR diminue au cours du développement de la racine principale et, en particulier, lors de sa tubérisation. Cette diminution suit la croissance de la racine qui, par conséquent, accumule le saccharose. Cette ANR s'annule vers le 140ème jour après semis, mais demeure faible dans la pointe de la racine.
- L'évolution de l'ANR foliaire suit celle des teneurs en nitrates foliaires. Par contre, au niveau du pétiole les teneurs élevées en nitrates et la faible ANR, contrairement au limbe, semble indiquer que le système réducteur de la nitrate réductase est situé au niveau du limbe. Par ailleurs, l'apport d'engrais de couverture sous forme d'urée augmente les teneurs en nitrates, mais n'affecte pas l'ANR dans les différents organes de la betterave à sucre. Ce phénomène observé montre qu'à partir de ce stade du cycle de la culture (120ème jour après semis), la plante ne bénéficierait pas de l'apport d'azote. Cet azote peut se perdre soit par dénitrification, soit par lixiviation ou lessivage sous forme de nitrates vers la nappe phréatique. Les betteraves qui ont reçu les doses faibles en azote atteignent la concentration critique (1 mg/g de MS) dans les pétioles plutôt que chez les betteraves ayant reçu des doses plus élevées. Ceci indique que la connaissance de la teneur en nitrates dans le pétiole à un moment donné du cycle de la culture constituerait un bon indicateur de la disponibilité d'azote dans le sol.
- L'azote a permis d'augmenter les teneurs en nitrate et l'activité nitrate réductase de la betterave à sucre, étant donné que cette enzyme est inductible par son substrat qui est le nitrate pour sa réduction en nitrite puis en ammonium

pour être incorporé dans les chaînes carbonées précurseurs d'autres composés tels que les acides aminés, ce qui augmente les teneurs en protéines de la plante ; d'où une bonne croissance et un bon développement de la betterave à sucre. Cette amélioration est surtout marquée pour la dose N250 et N400 kg/ha.

## RÉFÉRENCES CITÉES

- Bussi C., Habib R. & Salsac L. (1989) Mesures *in vivo* et *in situ* de l'activité nitrate réductase chez le pêcher (*Prunus persica* (L.) Batsch) *Agron.* 9 : 409-414
- Chu C.C., Graham L.E. & Bariola L.A. (1990) A method to assay *in vivo* nitrate réductase activity and nitrate-nitrogen content in cotton pétiotes. *Journal of the Agriculture. Association of China, New series* (152) :13-20
- Dorchies V. & Rambour S. (1983) Activité de la nitrate réductase mesurée *in vivo* chez *Cichorium intybus* (*var.witloof*) au cours du forçage. *Physiol. Veg.* 21(4) : 705-713
- Dorchies V. & Rambour S. (1985) Activité nitrate réductase chez *Cichorium intybus* (*var.witloof*) à différents stades de développement et dans les tissus cultivés *in vitro*. *Physiol. Veg.* 23(1) : 25-35
- Ferrari T.E. & Varner J.E. (1971) Intact tissue assay for nitrate réductase in barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 47 : 790-794
- Fleury A. & Caneill J. (1983) Croissance et développement de la betterave sucrière, Analyse de l'hétérogénéité du peuplement
- Guerrero M.G., Vega J.M. & Losada M. (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann.Rev. Plant Physiol.* 32 : 169-204
- Habib R.(1984) La formation des réserves azotées chez les arbres fruitiers. Revue bibliographique. *Fruits* 39 : 623-635
- Hewitt E.J. & Cutting C.V. (1979) Nitrogen assimilation of plants. Academic Press, Londres
- Hewitt E.J. (1975) Assimilatory nitrate-nitrite réduction. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26 : 73-100
- Jaworski E.G. (1971) Nitrate réductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43 : 1274-1279
- Jonas O.A., Pereyra M.C. , Cabeza C. , Golberg A.D. & Ledent J.F. (1992) Recovery of nitrate réductase activity in wheat leaves after a period of severe water stress. *Cereal Research Communications* 20(2):13-18
- Laby H. (1976). Physiologie Cultivar. Spécial betterave. Octobre, 17-19
- Laby H. (1985) La physiologie de la betterave explique ses exigences. *Cultivar - spécial Betteraves* 189 : 47-50
- Naman F., Ouaka A. & Zaoui D. (1994) Effet de l'azote et la date de semis sur le rendement et la qualité technologique de la betterave à sucre. *Sucrierie Maghrébine* 61 : 21-29
- Neveins D.J. & Loomis R.S. (1970). Nitrogen nutrition and photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Crop Science. Soc.of Am.* 10 : 21-25
- Robin P. (1979) Etude de quelques conditions d'extraction de la nitrate réductase des racines et des feuilles de plantules de maïs. *Physiol. Veg.* 17 : 45-54
- Robin P., Blayac D. & Salsac L. (1979) Influence de l'alimentation nitrique sur la teneur en nitrate et l'activité nitrate réductase des racines et des feuilles de plantules de maïs. *Physiol. Veg.* 17(1) : 55-66
- Rodier J. (1971) Analyse chimique de l'eau. Méthode au salicylate de sodium. Ed. Dunod, 4ème édition
- Sprent J.I. & Thomas R.T. (1984) Nitrogen nutrition of seedling grain legumes: some taxonomic morphological and physiological constraints. *Plant. Cell.* 7 : 637-645
- Touraine B. (1985) Relations feuilles/racines au cours de l'assimilation du nitrate chez le soja. Nutrition azotée des légumineuses, Versailles, 19-21 novembre, Ed. INRA, Paris, 1987. *Les Colloques de l'INRA* (37):101-108
- Ulrich A. & Hills F.j. (1973) Plant analysis as an aid in fertilizing sugar crops: I. sugar beets in L.M. Walsh and J.D. Beaton (eds.) soil testing and plant analysis, *Soil Sci. Soc. Am.*, Madison, Wisc., U.S.A.
- Ulrich A., Rierie D., Hills F.J., George A.G., Moore M.D. & Johnson C.M. (1959) I. Plant analysis, a guide for sugar beet fertilization; II. Analytical methods for use in plant analysis. *Calif. Agr. Exp. Sta. Bull.* 766