

## L'activité de la nitrate-réductase : une indication de l'état nutritionnel et des besoins en azote d'agrumes en vergers

A. SHAKED A. BAR AKIVA, K. MENDEL\*

### INTRODUCTION

Une des principales limites de l'analyse foliaire conventionnelle est qu'elle ne fournit pas d'informations sur les fonctions de l'élément étudié, excepté sa quantité totale dans le tissu végétal. L'approche biochimique de l'analyse de la plante vise à rectifier cette insuffisance par l'emploi d'un système enzymatique dans lequel l'élément testé joue un rôle clé (BAR-AKIVA, 1969).

La nitrate réductase (NR) est une molybdo-flavo-protéine dont l'activité est directement liée au niveau en nitrate dans le substrat, quand le molybdène et d'autres facteurs essentiels sont à leur niveau optimum (NICHOLAS et NASON, 1954 ; AFRIDI et HEWITT, 1964). Poursuivant dans notre laboratoire la démonstration de l'activité de la NR dans les feuilles d'agrumes (BAR-AKIVA et STERNBAUM, 1965 ; BAR-AKIVA et SAGIV, 1967) et de sa dépendance vis-à-vis du molybdène (SHAKED et BAR-AKIVA, 1967), il a été suggéré que la NR pouvait servir d'indicateur de l'état nutritionnel et des besoins en azote des agrumes. Tout d'abord des résultats encourageants furent obtenus sur de jeunes pomelos cultivés sur sol avec une fertilisation différenciée (BAR-AKIVA et STERNBAUM, 1965). Le contenu en NR et en N était directement lié à la quantité d'azote fournie aux plants. En outre il fut montré, en suivant la saturation de feuilles détachées intactes avec des nitrates, par exemple, que l'induction et l'activité de la NR de feuilles pauvres en N s'élevaient au niveau de feuilles riches en N. Ainsi le rapport NR induite/NR initiale donnait, non seulement une mesure de l'état initial en N des feuilles testées, mais aussi une indication de leur potentiel total d'assimilation des nitrates.

Dans cette communication, nous présentons les résultats de déterminations périodiques de la NR dans les conditions de vergers, nous discutons certaines des difficultés rencontrées et esquissons une orientation possible du futur travail sur ce sujet.

### MÉTHODES ET RÉSULTATS

Les échantillons de feuilles ont été prélevés dans des vergers en quatre localisations géographiques.

1. **Yesha'** - essai N, P, en place depuis 1965 sur des arbres de 10 ans - Shamouti greffé sur lime douce.

Les traitements N<sub>1</sub>, 6 kg N/an, et N<sub>3</sub>, 18 kg N/an, ont été échelonnés.

2. **Mivtahim** - essai N, P, K, en place depuis 1966 sur des arbres de 11 ans - Shamouti greffé sur lime douce.

Les traitements N<sub>1</sub> 5 kg N/an  
N<sub>1</sub>P<sub>2</sub> 5 kg N - 10 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/an  
N<sub>4</sub>P<sub>1</sub> 20 kg N - 5 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/an  
N<sub>4</sub>P<sub>2</sub> 20 kg N - 10 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/an

ont été échantillonnés.

Ces deux vergers recevaient une fertilisation différenciée depuis trois ans au moment de l'échantillonnage.

3. **Yavne** - essai N, P, K, sur des arbres de 15 ans - Valencia greffé sur bigaradier.

Les traitements N<sub>1</sub>, 6 kg N/an, et N<sub>2</sub>, 12 kg N/an, ont été échantillonnés.

4. **Bet Dagan** - essai de dates d'apport de N.

Les traitements 1. apport de 75 kg de sulfate d'ammonium en février

2. témoin - sans engrais

ont été échantillonnés.

#### Méthode d'échantillonnage.

Les feuilles de rameaux terminaux non fructifères sont prélevées suivant la technique décrite précédemment (SHAKED et al., 1972).

Le verger Yesha' a été échantillonné six fois, à un mois d'intervalle, durant l'été et l'automne 1967, en débutant en juin. Les vergers Mivtahim et Yavne l'ont été quatre fois de décembre 1968 à mars 1969.

Les mesures de NR et les déterminations de nitrates ont été conduites suivant la méthode déjà décrite (SHAKED et al., 1972).

\* - The Volcani Center - Agricultural Research Organization Division de Citriculture - BET DAGAN (Israël).

Communication présentée au Premier Congrès international d'Agrumiculture, Murcie (Espagne), avril 1973.

Des feuilles de quatre à huit mois furent prélevées sur des citronniers de semis de un an cultivés en serre et sur solution (HEWITT, 1966) avec trois niveaux d'azote.

#### Progrès de la méthode d'induction de la NR.

Dans le tableau 1 figurent les valeurs de NR types obtenues en plaçant, pendant une heure à la lumière et à la température de la pièce, des feuilles dans un béccher contenant une solution de  $KNO_3$  - 0,05 M - ou de l'eau. Une moitié des feuilles est placée dans la solution de  $KNO_3$ , pour la détermination de la NR induite, l'autre moitié dans l'eau pour mesurer la NR initiale.

La période d'induction d'une heure, relativement courte, produit dans les feuilles déficientes en N une activité de NR induite égale ou même supérieure à celle des feuilles normales. C'est un progrès par rapport à la méthode initiale d'induction de la NR dans des feuilles de pomelo (BAR-AKIVA et STERNBAUM, 1965) qui nécessitait un traitement de nuit.

## RÉSULTATS

#### Induction de la NR en champ (figure 1).

Des 'Valencia', greffés sur bigaradier, ont été pulvérisés avec une solution à 4 p. cent de  $KNO_3$  (200 kg de  $KNO_3$ /ha); les feuilles ont été échantillonnées 2, 24, 48 et 96 heures plus tard. Des feuilles témoins ont été obtenues en enfermant des branches dans de grands sacs de polyéthylène.

La pulvérisation de  $KNO_3$  a un effet sur la NR identique à celui de la pénétration de nitrates dans les feuilles détachées, qui est notre méthode pour l'induction de la NR. Ces résultats (figure 1) confirment l'hypothèse que notre induction de la NR et la méthode essayée traduisent bien l'activité *in vivo* dans les arbres.

#### Activité de la NR dans des feuilles prélevées en vergers.

**Vergers Yesha'** - les résultats des six échantillonnages d'été et d'hiver (30 juin au 3 novembre 1967) sont donnés (figure 2). Les données de juillet et août n'ont pas été introduites dans l'analyse statistique du tableau 2.

Les courbes du rapport  $NR_2/NR_1$  (figure 2) confirment notre observation (SHAKED et al., 1972) à propos de l'instabilité de la NR en été.

TABLEAU 1 - Induction de la NR dans des feuilles de pomelos cultivés en serre et à trois niveaux d'azote.

Niveau d'azote dans la solution nutritive (N)	Symptômes foliaires	NR initiale (NR <sub>1</sub> )	NR induite (NR <sub>2</sub> )	NR <sub>2</sub> /NR <sub>1</sub>
		m $\mu$ moles NO <sub>2</sub> /g/h		
1/5	déficiência sévère en N	605	2270	3,8
1/2	déficiência moyenne en N	890	1910	2,1
1	feuilles normales	1240	1420	1,1

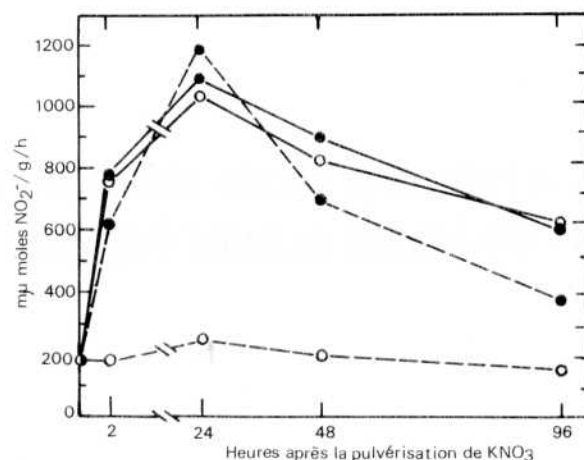


Figure 1 • NR initiale (○) et NR induite (●) sur des feuilles d'oranger Valencia traitées avec 4 % de  $KNO_3$  pulvérisé en vergers (—), comparées à des feuilles non traitées (---).

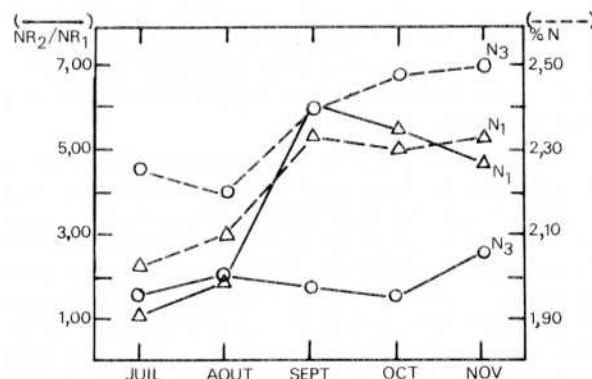


Figure 2 • Rapport NR induite/NR initiale ( $NR_2/NR_1$ ) de 6 échantillons mensuels de feuilles dans le verger de Yesha' en comparaison avec l'azote total.

Dans ce verger, il faut remarquer que les mesures d'automne de NR, exprimées en  $NR_2/NR_1$ , reflètent les traitements azotés aussi bien que font les rendements.

**Vergers Mivtahim** - l'accord entre les valeurs de la NR - particulièrement le rapport  $NR_2/NR_1$  - et l'azote total de ce verger (tableau 3), est probablement dû surtout à l'époque d'échantillonnage : ici l'hiver, qui est évidemment plus valable pour les mesures de la NR (SHAKED et al., 1972),

TABLEAU 2 - NR, NR<sub>2</sub>/NR<sub>1</sub> et N total dans des échantillons de feuilles d'automne (septembre-novembre) et récolte de fruits dans le verger de Yesha'.

Traitement	NR <sub>1</sub>	NR <sub>2</sub> /NR <sub>1</sub>	p. cent N	récolte (kg/arbre) 1968-1969
	m $\mu$ moles NO <sub>2</sub> /g/h			
N <sub>3</sub>	442 $\pm$ 144	2,37 $\pm$ 0,55	2,46 $\pm$ 10	71,2 $\pm$ 12,7
N <sub>1</sub>	167 $\pm$ 61	7,17 $\pm$ 2,33	2,32 $\pm$ 09	37,1 $\pm$ 7,3
signif.	NS	*	NS	*
F	3,09	4,2	1,15	4,44

TABLEAU 3 - N total dans les feuilles et récoltes d'arbres Shamouti greffés sur lime douce dans le verger Mivtahim.

Traitement	NR <sub>1</sub>	NR <sub>2</sub>	NR <sub>2</sub> /NR	p. cent N	1968/69	1969/70	1968/69 1969/70
	m $\mu$ moles NO <sub>2</sub> /g/h						
N <sub>1</sub>	720 $\pm$ 88	1806 $\pm$ 282	2,51 $\pm$ 0,25	1,68 $\pm$ 0,05	31,5 $\pm$ 7,1	27,0 $\pm$ 6,2	29,3 $\pm$ 11,5
N <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	628 $\pm$ 223	1668 $\pm$ 157	2,92 $\pm$ 0,40	1,91 $\pm$ 0,08	55,6 $\pm$ 4,2	42,1 $\pm$ 5,1	48,9 $\pm$ 4,5
N <sub>4</sub> P <sub>1</sub>	973 $\pm$ 148	1513 $\pm$ 207	1,64 $\pm$ 0,15	2,39 $\pm$ 0,04	52,3 $\pm$ 3,6	36,8 $\pm$ 9,4	44,6 $\pm$ 5,5
N <sub>4</sub> P <sub>2</sub>	1293 $\pm$ 147	1750 $\pm$ 165	1,45 $\pm$ 0,14	2,31 $\pm$ 0,09	47,8 $\pm$ 5,8	43,0 $\pm$ 4,6	45,0 $\pm$ 3,5
signif.	**	NS	***	***	NS	NS	NS
F	4,33	0,38	10,66	14,12	1,46	1,01	1,64

TABLEAU 4 - Essais NR, N total dans les feuilles et récoltes de Valencia greffés sur bigaradier dans le verger Yavne - Bashit.

Traitement	NR <sub>1</sub>	NR <sub>2</sub>	NR <sub>2</sub> /NR	p. cent N	Récolte (kg/arbre)		
					1969	1970	1969 + 70
	m $\mu$ moles NO <sub>2</sub> /g/h						
N <sub>1</sub>	526 $\pm$ 60	2080 $\pm$ 208	2,12 $\pm$ 0,10	2,32 $\pm$ 0,04	70,0 $\pm$ 3,9	41,4 $\pm$ 8,6	55,6 $\pm$ 6,0
N <sub>2</sub>	723 $\pm$ 71	1042 $\pm$ 98	1,50 $\pm$ 0,09	2,48 $\pm$ 0,02	99,0 $\pm$ 7,5	64,8 $\pm$ 13,2	81,9 $\pm$ 9,7
signif.	**	NS	***	***	***	NS	**
F	4,46	0,10	21,75	10,75	11,71	2,20	5,33

TABLEAU 5 - Les nitrates et la NR de Shamouti greffés sur bigaradier (Bet Dagan) fertilisés ou non en azote (75 kg de sulfate d'ammonium), échantillonnés en hiver et en été.

Traitement 1969	Echantillon d'été 8-22/6/69	NR	Echantillon d'hiver 26/2 - 2/3/1969	NR
	Nitrates (ppm)	m $\mu$ moles NO <sub>2</sub> /g/h	Nitrates (ppm)	m $\mu$ moles NO <sub>2</sub> /g/h
avec N	286 $\pm$ 65	244 $\pm$ 52	15 $\pm$ 2	2369 $\pm$ 254
sans N	76 $\pm$ 26	223 $\pm$ 34	17 $\pm$ 2	1710 $\pm$ 180
signif.	***	NS	NS	*
F	9,09	0,12	0,04	4,46

comme l'indiquent les variations plus faibles que dans les tests de la NR à Yesha' (tableau 2).

Comme on pouvait s'y attendre, il n'y a pas eu de différences entre les valeurs de la NR<sub>2</sub> des différents traitements, puisque la NR induite de feuilles pauvres en azote devait être égale ou même supérieure à celle de feuilles riches en azote (tableau 1). Aussi le rapport NR<sub>2</sub>/NR<sub>1</sub> était-il plus significatif que NR<sub>1</sub>.

Au verger Yavne, (tableau 4) outre l'accord entre la NR et l'azote total, il y a eu des différences significatives entre

la récolte des deux traitements échantillonnés à la saison d'échantillonnage foliaire et un défaut de signification l'année suivante bien que la tendance persiste.

Nous avons montré (SHAKED et al., 1972) que les nitrates foliaires étaient en liaison inverse avec la NR, aussi nous pensions qu'il était intéressant de voir si les nitrates foliaires réfléchiraient les différences du régime de fertilisation azotée. Des résultats préliminaires (tableau 5) montrent des différences hautement significatives entre les arbres témoins, sans azote, et normalement fertilisés.

## DISCUSSION

Nous avons montré (SHAKED et al., 1972) que la NR, au champ, est non seulement instable en été, mais présente aussi une tendance saisonnière avec maximum en hiver et minimum en été. Aussi, il ne fut pas surprenant que les différences entre les mesures de la NR en été (verger Yesha') soient non significatives et que celles d'automne le soient.

L'interprétation des essais à Mivtahim présente certaines difficultés, puisque les quatre traitements azotés ont marqué à la fois sur l'azote total et le rapport  $NR_2/NR_1$ , mais pas sur les rendements. Il semble plausible de dire que, dans ce verger, l'azote pouvait ne pas être le facteur limitant ou tout au moins pas le seul. Les rendements, faibles dans l'ensemble, indépendamment du traitement, corroborent cette hypothèse. Il faut remarquer qu'à Mivtahim le rapport  $NR_2/NR_1$  a donné une valeur plus élevée au test F, donc une signification plus grande, que  $NR_1$ . Ainsi, en se référant au rapport  $NR_2/NR_1$ , de préférence à  $NR_1$ , nous avons pu maîtriser une part de la variabilité due à la sensibilité de NR aux conditions externes.

De nos données, tableaux 1, 3, 4) il apparaît qu'un rapport NR induite/NR initiale de  $1,5 \pm 0,15$  indique un niveau optimum de l'azote des arbres testés. Une déficience moyenne en azote se traduira par une valeur du rapport de  $2,0 \pm 0,20$ . Une déficience modérée à sévère se détectera aisément par une valeur du rapport égale ou supérieure à 3,0. Dans certains cas la mesure de l'azote total donne des valeurs équivoques. Dans le tableau 4 nous avons un tel cas : à des valeurs du rapport de la NR de 2,12 pour le traitement  $N_1$  et de 1,50 pour  $N_2$  correspondent des teneurs en azote total de 2,32 et 2,48 ; toutes deux se trouvant dans la zone optimale (REUTHER et al., 1962).

Les systèmes enzymatiques sont sans aucun doute complexes et nécessitent l'intégration de facteurs nutritionnels nombreux. Cependant un tel système, la NR ici, ne peut prétendre intégrer exactement les mêmes facteurs que ceux qui sont impliqués dans le terme « rendement ». Dans ce texte, nous avons pu interpréter les résultats des essais à Yavne en supposant tous les facteurs essentiels voisins des

conditions optimales, l'azote excepté, ce qui nous permet d'obtenir un accord entre toutes les mesures d'évaluation de l'azote et le rendement. Nous suggérons que, pour évaluer pleinement le potentiel d'analyse biochimique des plantes, chaque échantillon foliaire soit testé pour plusieurs systèmes enzymatiques ou autres systèmes biochimiques, la méthode serait à la fois plus significative et pratique.

La variabilité relativement haute des systèmes enzymatiques est liée à leur avantage de base, à savoir l'emploi de systèmes dynamiques *in vivo*. Naturellement, de tels systèmes varient d'une date d'échantillonnage à une autre, comme cela apparaît dans les résultats d'essais biochimiques. La difficulté dans l'interprétation tient à ce que, pour les arbres fruitiers, le terme rendement signifie une seule valeur annuelle, une moyenne annuelle correspondante des mesures biochimiques doit donc être établie. Pour déterminer la saison adéquate de l'échantillonnage et le nombre de répétitions nécessaires, nous sommes aidés par les études de stabilité, aux conditions externes spécifiques, de l'enzyme utilisée (SHAKED et al., 1972). Les systèmes enzymatiques qui présentent une stabilité saisonnière sont préférables à ceux à fluctuations saisonnières élevées.

La différence hautement significative du contenu foliaire en nitrate des arbres témoins et fertilisés en azote (tableau 5), indique la possibilité d'une approche de l'analyse de la plante combinant les avantages des méthodes chimiques et biochimiques. Les nitrates sont le substrat de la nitrate réductase et, puisque nous avons mis en évidence une relation inverse entre les deux (SHAKED et al., 1972), il est clair que la détermination du nitrate des feuilles d'agrumes complète l'information donnée par la mesure de la NR et peut même la remplacer sous certaines conditions. Une approche similaire de l'estimation de l'état nutritif en potassium utilisant les amines libres a été suggérée par HOFFMAN (1970).

Puisque cette approche imposait l'estimation de substrats ou de produits des systèmes enzymatiques, elle pouvait être considérée comme un constituant intégral de l'analyse biochimique de la plante, quand bien même elle partagerait les avantages pratiques de l'analyse chimique de la plante.

## BIBLIOGRAPHIE

- AFRIDI (M.M.R.K.) and HEWITT (E.J.). 1964.  
The inducible formation and stability of nitrate reductase in higher plants.  
*J. exp. Bot.*, 15, 251-271.
- BAR-AKIVA (A.). 1969.  
The use of metallo-enzyme systems for the appraisal of nutritional requirements of Citrus trees.  
*Proc. Ist. Int. Citrus Symp.*, 3, 1551-1557.
- BAR-AKIVA (A.) and SAGIV (J.). 1967.  
Nitrate reductase in the Citrus plants properties, assay conditions and distribution within the plant.  
*Physiologia Pl.*, 20, 500-506.
- BAR-AKIVA (A.) and STERNBAUM (J.). 1965.  
Possible use of nitrate reductase activity of leaves as a measure of the nitrogen requirement of Citrus trees.  
*Pl. Cell Physiol.*, 6, 575-577.
- HEWITT (E.J.). 1966.  
Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition.  
*Tech. Commun. Commonw. Bur. Hort. Plantn. Crops*, 22, 2nd ed.
- HOFFMAN (M.). 1970.  
The effect of potassium nutrition on fruit trees and its relation to high levels of calcium and magnesium in the root zone.  
*Ph. D. thesis, Hebrew University of Jerusalem, Israel, (Hebrew, with english summary).*
- NICHOLAS (D.J.D.) and NASON (A.). 1954.  
Molybdenum and nitrate reductase.  
*J. biol. Chem.*, 207, 352-360.
- REUTHER (W.), JONES (W.V.), EMBLETON (T.V.), LABANAUSKAS (C.K.). 1962.  
Leaf analysis as a guide to orange nutrition.  
*Bett. Crops*, 46, 3, 44-49.
- SHAKED (A.) and BAR-AKIVA (A.). 1967.  
Nitrate reductase activity as an indication of molybdenum level and requirement of Citrus plants.  
*Phytochemistry*, 7, 347-349.
- SHAKED (A.), BAR-AKIVA (A.) and MENDEL (K.). 1972.  
Effect of water stress and high temperature on nitrate reduction in Citrus leaves.  
*J. Hort. Sci.*, 47, 183-190.