

EFFET DE LA FERTILISATION AZOTEE SUR L'ACTIVITE PEP CARBOXYLASE DANS LE CONTROLE DE L'ACCUMULATION DE L'HUILE ET DES PROTEINES PENDANT LE DEVELOPPEMENT DES GRAINES DE COLZA

E.D. TITTONEL – E.N.E.S.A.D. – BP 48 – 21802 QUETIGNY – France

P. KUCHTOVA – V.S.Z. – 165 21 PRAHA 6 – Suchdol – Czech Republic

S. CINTI, S. PALMIERI – Istituto Sperimentale per le Colture Industriali – 40129 BOLOGNA – Italia

## RESUME

L'évolution biochimique de la graine de colza peut se diviser en trois périodes. La première le glucose passe par un pic. Après ce pic, le niveau atteint son niveau minimum qui se maintiendra jusqu'à la récolte, alors que l'activité de la PEP case passe par son maximum. La vitesse d'accumulation de l'huile et des protéines est maximum. La troisième période est celle des dernières accumulations de protéines et d'huile. La fertilisation azotée se traduit par une activité de la PEP case beaucoup plus élevée sur toutes les branches. Ceci pourrait mettre en évidence l'importance de cette enzyme dans l'accumulation des réserves et l'élaboration du rendement.

## 1. INTRODUCTION

Surtout connue chez les plantes en C<sub>4</sub>, la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) est une enzyme également importante chez les plantes en C<sub>3</sub>. On la qualifie volontiers de "enzyme clé" (BRULFERT *et al.*, 1983). LATZKO et KELLY (1983) lui attribuent, entre autres, une fonction dans la reprise du CO<sub>2</sub> respiré, dans l'assimilation de l'azote et la synthèse d'acides aminés ainsi que dans la synthèse des lipides. Chez les plantes oléagineuses, la PEPC est active en particulier dans les graines en cours de développement (SINGAL *et al.*, 1987) et selon SANGWAN *et al.*, (1992) plus spécialement pendant l'accumulation des lipides. La synthèse des acides gras chez le ricin (SMITH *et al.*, 1992) requiert en effet surtout la présence de malate obtenu par exemple, à partir du phosphoenolpyruvate (PEP) grâce à la PEPC. Cependant, malgré son importance, cette enzyme, la PEPC, a été peu étudiée dans une des principales plantes oléagineuses : le colza. Dans ce travail, notre but est de re-situer l'activité de la PEPC par rapport à d'autres constituants (teneur en huile, en protéines solubles et totales, glucose) lors du développement de la graine de colza.

## 2. MATERIEL ET METHODES

Matériel et techniques culturales : la plante étudiée est du colza d'hiver *Brassica napus* L. var oleifera Metz cultivar Cerès cultivé en Bourgogne, dans l'Est de la France sur un sol de bonne qualité. La conduite de la culture depuis le travail du sol, le semis (23 Août 1992) la fertilisation, le désherbage la lutte contre les maladies et ravageurs jusqu'à la récolte (7 Juillet 1993) ont été réalisés suivant un itinéraire classique pour la région.

Fertilisation et prélèvement des échantillons : Deux régimes de fertilisation azotée ont été adoptés : (i) une fertilisation complète de 280 unités(N280) apportée en 5 fois depuis le 11 Février jusqu'au 25 Mars ; (ii) une fertilisation de 60 unités le 11 Février (N60)

Prélèvements : Dans notre expérimentation, seules ont été prises en compte la grappe terminale (R0) la troisième (R3) et la sixième (R6) comptées en partant de R0. Les graines fraîches (20 g.) ont été extraites des siliques de la base de ces grappes. Ces graines ont été

immédiatement plongées dans l'azote liquide et elles ont ensuite été conservées en congélateur. Les prélèvements ont commencé le 5 Mai et se sont poursuivis tous les 5 à 6 jours jusqu'au 5 Juillet.

**Analyses chimiques :** La teneur en huile a été déterminée par la méthode Soxhlet et les protéines totales par la méthode Kjeldhal ( $N \times 6,25$ ). La détermination des glucosinolates totaux et du glucose s'est faite par la méthode polarographique (IORI *et al.*, 1983). Les protéines solubles ont été déterminées par le méthode de BRADFORD (1976). Finalement l'humidité des graines a été évaluée par gravimétrie après séchage à  $105^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures.

**Activité PEP:** L'enzyme a été extraite selon la méthode rapportée par SANGWAN *et al.*, (1992) et a été dosée selon celle décrite par SINGAL *et al.*, (1987)

### 3. RESULTATS

#### 3.1 Résultats généraux :

Quel que soit le traitement et la grappe considérée, les courbes relatives à 1000 graines ont toujours la même allure (Fig. 1). On distingue trois phases: (i) la première est celle du pic de glucose, l'activité de la PEPC augmente fortement alors que les teneurs en protéines et en huile sont à peine mesurables; (ii) pendant la seconde phase, l'activité de la PEPC passe par un maximum, la teneur en glucose est désormais à son niveau minimum alors que l'huile et les protéines totales s'accumulent rapidement; finalement (iii) ensuite, pendant la troisième phase, les processus engagés au cours de la phase deux se terminent, la teneur en protéines totales se stabilise alors que la teneur en huile continue à croître jusqu'à la fin.

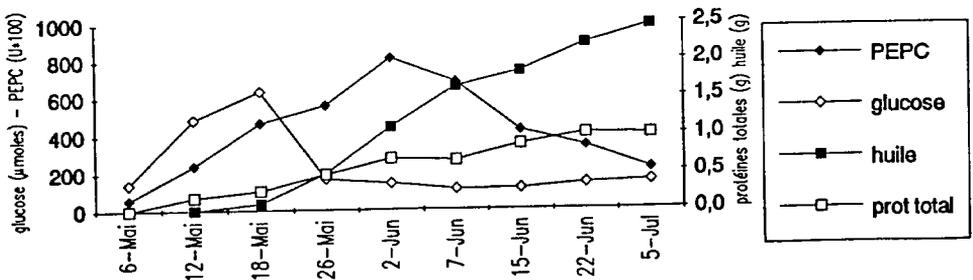


Fig. 1 Activité rapportée à 1000 graines de la PEPC et quantité de glucose, huile et protéines totales au cours de la formation des graines de colza. Cas de N280 sur R0.

#### 3.2 Résultats selon les traitements

Les résultats obtenus en 1991 par IORI *et al.* montraient que, en Italie, le rendement en graines est d'autant plus élevé que le glucose atteint son niveau minimum plus rapidement. Dans nos conditions de culture, le poids de graines récoltées diminuent en passant de la R0 aux grappes inférieures R3 et R6 (Tab. I). Parallèlement dans R3 et R6, qui ont nettement moins de graines que R0, les dates de minimum de glucose sont de plus en plus tardives. Ceci reflète leur retard de la floraison, la réduction de la durée d'accumulation des substances de réserve et finalement un poids de mille graines plus faible. De plus, on constate que le pic de PEPC en passant de R0 à R6 est lui aussi de plus en plus étalé et tardif. On peut donc penser que pendant

la première période, toutes les enzymes nécessaires pour l'accumulation des substances de réserves (et non pas seulement la PEPC dosée ici) sont en phase de synthèse.

Tab. I – Composantes du rendement de chaque grappe selon la fertilisation.

Fertilisation N (U)		R0	R3	R6
60	Nb. graines	951	523	234
	PMG	4,90	4,23	4,23
	poids (mg)	4660	2212	990
280	Nb. graines	1165	722	195
	PMG	5,28	4,35	4,36
	poids (mg)	6151	3141	850

Finalement, en ce qui concerne l'effet de la fertilisation azotée, nous constatons tout d'abord que, de façon classique, les échantillons N280 sont plus productifs. Et ici aussi, les pics de glucose des trois grappes sont légèrement plus précoces. Quant à la PEPC exprimée en fonction du poids frais, son activité est supérieure pour N280 seulement dans le cas de R3 et de R6. (Tab. II). En effet, la faible fertilisation azotée (60 U) – ou la minéralisation naturelle du sol – ont peut être suffisantes pour permettre une bonne activité enzymatique chez la R0 qui est prioritaire. En revanche, exprimée pour 1000 graines, l'activité PEPC est supérieure pour les trois ramifications de N280. Le manque d'azote se marque donc d'abord sur l'activité enzymatique et en particulier sur celui de cette enzyme clé qu'est la PEPC, et ensuite sur la teneur en protéines des graines.

Tab. II– Activité maximum de la PEPC (U/par gramme de poids frais).

Fertilisation N(U)	R0	R3	R6
60	0,84	0,51	0,5
280	0,82	0,69	0,57

#### Références bibliographiques

- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brulfert J., Kluge M., Queiroz O. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase : a key-enzyme in plants. *Physiologie Végétale*, **21**, 803-804
- Iori R., Leoni O., Palmieri S. (1983). A simultaneous determination of total glucosinolates and free glucose of cruciferous material. *Analytical Biochemistry*, **134**, 195-198.
- Iori R., Leoni O., Lazzeri L., Mosca G., Palmieri S. (1991) Importance of some biochemical parameters in the quality and yield of rapeseed (*Brassica napus* L. ). *Journal of Agronomy and Crop Science*, **167**, 91-95.
- Latzko E., Kelly G.J. (1983). The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C3 plants. *Physiologie Végétale*, **21**, 805-815.
- Sangwan R.S., Singh N., Plaxton W.C. (1992). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and concentrations in the endosperm of developing and germinating castor oil seeds. *Plant Physiology*, **99**, 445-449.
- Singal H.R., Sheroan J.S., Singh R. (1987). Photosynthetic carbon fixation characteristics of fruiting structures of *Brassica napus* L. *Plant Physiology*, **83**, 1043-1047.
- Smith G.R., Gauthier D.A., Dennis D.T., Turpin D.H. (1992). Malate- and pyruvate dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor endosperm. *Plant Physiology*, **98**, 1233-1238.