

VARIATIONS DE LA COMPOSITION AZOTÉE DE *PINUS CANARIENSIS* AU COURS DE LA GERMINATION

M. SAGHI et J. CITHAREL

Département de Biologie, Université Mohammed V, Rabat, Maroc

(Révisé reçu le 16 novembre 1977)

Key Word Index—*Pinus canariensis*; Pinaceae; amino acids; seed germination; arginine.

Abstract—The study of the different nitrogen fractions of *Pinus canariensis* during seed germination and seedling development indicates a progressive hydrolysis of the insoluble fraction. Arginine is quantitatively one of the most important amino acids in seed proteins.

INTRODUCTION

L'importance quantitative de l'arginine dans les plantules de conifères (*Pinus sylvestris*, *Picea excelsa*, *Abies pectinata*) est apparue depuis fort longtemps [1]. L'origine de cet acide aminé chez ces plantes a été connue quelques années plus tard. Les protéines de la graine contiennent une concentration importante de ce constituant, qui est libéré par hydrolyse au moment de la germination, en particulier chez *Pinus pinea*, *P. thunbergii*, *Picea excelsa* et *Abies nordmanniana* [2]. Le métabolisme de l'arginine a pu être précisé par la suite chez *P. pinea*, en particulier ses relations métaboliques avec les amides, glutamine et asparagine [3]. Mais cet acide aminé est hydrolysé et synthétisé dans le cadre du cycle de Krebs et Henseleit [4], comme l'ont montré Naylor et Barnes [5] chez *Pinus serotina*, *P. clausa*, *P. palustris*, *P. elliotii*, et Guitton [6] chez *Pinus pinea*. Les relations métaboliques de ce cycle avec le métabolisme des amides d'une part, et de la proline d'autre part, étaient également mises en évidence par ces différents auteurs. Des travaux plus récents, entrepris sur *Pinus banksiana* et *Picea glauca* ont confirmé les résultats antérieurs et montré, en outre, les relations métaboliques qui existent entre l'arginine et des guanidines monosubstituées particulières [7–12]. Ces dernières recherches ont aussi précisé certaines voies d'utilisation de l'urée-¹⁴C par *Picea glauca* [7e].

Il était intéressant d'étendre ces travaux entrepris sur le métabolisme de l'arginine chez les conifères à une

espèce non encore étudiée, le pin des Canaries (*Pinus canariensis*). Cette espèce présente, en outre, un intérêt lié au fait qu'elle se développe dans des conditions climatiques assez sévères, entraînées par des températures relativement élevées et une sécheresse prolongée. Les conditions climatiques semblent en effet avoir une répercussion sur le métabolisme, notamment celui des amides dans les plantules [8]. Il semblait aussi souhaitable de réaliser un travail plus particulier sur les systèmes enzymatiques, peu étudiés jusqu'à présent.

Les premières recherches ont porté sur certaines essences forestières importantes du Maroc, pour le reboisement et la protection des sols: pin d'Alep, pin des Canaries, pin maritime variété maghrébienne. Les résultats obtenus pouvaient permettre, si nécessaire, d'améliorer les conditions de germination de ces espèces.

RESULTATS ET COMMENTAIRES

Evolution des fractions azotées totale, soluble et insoluble au cours de la germination et du développement de la plantule

Le bilan azoté varie très peu du stade 'graine sèche' à la 'jeune plantule' (Tableau 1). Ceci résulte des variations inverses des concentrations des composés azotés totaux dans l'endosperme (89.0–76.3% des valeurs de Nt) et dans l'embryon (11.0–23.7% de Nt) (Tableau 2). Ces résultats s'expliquent par le fait que la graine est pratiquement autonome par rapport au milieu extérieur pendant les premiers stades de son développement.

Après 30 jours de croissance, la plantule présente

Tableau 1. Caractéristiques des différents échantillons étudiés du pin des Canaries

Stades de développement	Graine			Jeune plantule	Plantule		
	sèche	imbibée	germée		racine	hypocotyle	cotylédons
Âge de l'échantillon (jours)	0	2	6	15		30	
Longueur (mm)	12.4	12.4	13.2	30.0	46.0	18.7	52.5
Poids frais/100 échantillons (g)					3.7	5.7	21.2
+ graine entière	14.2						
+ amandes	7.2	8.6	11.8	17.5			
○ endospermes	6.0	6.7	9.5	10.2			
○ embryons	1.2	1.2	2.2	7.4			

Tableau 2. L'azote total, soluble et insoluble du pin des Canaries, à différents stades de la germination de la graine

Stades de développement	Organes	Azote total		Azote soluble		Azote insoluble	
		mg/100 ind.	% de Nt	mg/100 ind.	% de Nt	mg/100 ind.	% de Nt
Graines sèches	Endospermes	367.6	89.0	13.6	3.8	353.9	96.2
	Embryons	45.4	11.0	3.8	8.7	41.5	91.3
	Graines entières	413.0		17.5	4.2	395.5	95.8
Graines imbibées	Endospermes	346.7	87.1	40.5	11.7	306.2	88.3
	Embryons	51.2	12.9	3.5	6.7	47.7	93.1
	Graines entières	397.9		44.0	11.1	353.9	88.9
Graines germées	Endospermes	325.0	85.7	43.0	13.2	282.0	86.8
	Embryons	53.0	14.3	6.0	11.4	47.0	88.6
	Graines entières	378.0		49.0	13.0	329.0	87.0
Jeune plantule	Endospermes	286.2	76.3	75.0	26.3	211.2	73.7
	Embryons	88.7	23.7	14.0	15.8	74.7	84.2
	Graines entières	375.0		89.0	23.8	286.0	76.2
Plantules	Cotylédons	297.0	73.8	216.5	72.9	80.5	27.1
	Hypocotyles	79.5	19.7	38.0	47.8	41.5	52.2
	Racines	25.5	6.3	13.5	53.0	12.0	47.0
	Plantules entières	402.0		268.0	66.7	134.0	33.3

une quantité de composés azotés équivalente à celle de la 'graine sèche'. A ce stade, les composés azotés de l'endosperme ont donc été transférés presque totalement dans cette plantule. A ce moment, la plus grande partie des substances azotées se situe dans les cotylédons (73.8% de la somme). L'hypocotyle et les racines en contiennent beaucoup moins (19.7 et 6.3 %, respectivement). Ainsi, les cotylédons acquièrent dans la 'plantule' le rôle d'organe de réserve, qui revenait à l'endosperme aux stades précédents. De plus, par leur pouvoir assimilateur (photosynthèse), ils doivent permettre à la plantule de suppléer à la perte de l'endosperme.

Des remaniements importants ont lieu dans les fractions azotées insoluble et soluble. L'azote insoluble, de nature protéique essentiellement, représente la part la plus importante de la fraction azotée totale de la graine et de la plantule, dans l'embryon comme dans l'endosperme. Au cours de la germination, les concentrations des composés azotés insolubles diminuent, alors que celles de la fraction soluble augmentent. Les variations sont plus marquées pour l'endosperme que pour l'embryon. Après 30 jours, les composés azotés insolubles deviennent prépondérants dans les cotylédons (72.9% de Nt), mais ils sont également bien représentés dans l'hypocotyle (47.8 %) et les racines (53.0 %).

Ainsi, la quantité totale d'azote ne varie pratiquement pas au cours des 30 premiers jours du développement de l'embryon en plantule chez le pin des Canaries, lorsque le milieu de culture n'est pas approvisionné en composés azotés. Mais il se produit une hydrolyse progressive des fromes insolubles de l'azote (protéines), dans l'endosperme et dans l'embryon. Cette hydrolyse ne semble pas pouvoir être imputée à une carence quelconque, les substances de réserve de la graine permettant le développement normal de l'embryon jusqu'au stade considéré. Ces faits sont tout à fait comparables à ceux mis en évidence chez une autre espèce de conifères, le pin pignon [6], pourtant cultivé sur un milieu nutritif complet. Chez cette dernière espèce des protéases provoquent une hydrolyse progressive des protéines de réserve de la graine.

Evolution de la fraction aminée protéique au cours de la germination et du développement de la plantule

Des 16 acides aminés dosés dans les hydrolysats, l'acide glutamique et l'arginine sont les constituants prépondérants de la fraction aminée protéique, à tous les stades de développement et dans tous les organes (ils représentent environ 30 % de la somme des acides aminés protéiques). Ensuite, la proline, l'acide aspartique, la sérine, la glycine, la leucine et l'alanine constituent ensemble 45 %, de la totalité des acides aminés protéiques (Tableau 3).

Malgré quelques différences, les compositions globales des protéines de l'embryon et de l'endosperme sont très voisines. Mais, au stade 'plantule', les cotylédons se distinguent nettement de l'hypocotyle et des racines, à cet égard.

Les résultats mettent en évidence une hydrolyse progressive des protéines au cours du développement du pin des Canaries. Dans l'embryon, cette hydrolyse se manifeste plus nettement au moment de l'imbibition. Mais des protéines nouvelles doivent se synthétiser dès la germination, comme le montre l'augmentation de la somme des acides aminés protéiques à partir de ce stade. Cette augmentation s'accroît dans la 'jeune plantule' et, surtout, dans la 'plantule'.

Dans l'endosperme, on constate une diminution progressive de la quantité des acides aminés protéiques totaux, de la 'graine sèche' à la 'jeune plantule'. Cette baisse doit correspondre, comme pour le pin pignon [6], à une hydrolyse progressive des protéines de réserve de cet organe, au profit de l'embryon.

Les variations individuelles des acides aminés protéiques sont peu marquées, sauf pour l'acide glutamique, dont les concentrations diminuent d'une manière importante dans la 'plantule', et pour l'acide aspartique, qui présente l'évolution inverse.

Les variations qui intéressent les concentrations des acides aminés protéiques au cours de la germination du pin des Canaries sont beaucoup moins marquées que celles signalées pour le pin pignon [6]. Toutefois,

Tableau 3. Les acides aminés protéiques du pin des Canaries, à différents stades de la germination de la graine (en pourcentage de chaque acide aminé par rapport à leur somme, qui est également donnée en μmol pour 100 individus)

Stades de développement	Graine 'sèche'		Graine 'imbibée'		Graine 'germée'		Jeune plantule		Plantule		
	Embryon	Endosp.	Embryon	Endosp.	Embryon	Endosp.	Embryon	Endosp.	Cotyl.	Hypocot.	Racines
Arginine	12.59	14.92	12.30	14.48	11.35	14.92	14.58	13.92	21.20	6.06	0.65
Lysine	4.31	2.18	2.36	2.28	2.44	1.50	5.97	3.77	4.77	2.50	1.20
Histidine	2.07	2.60	4.57	1.80	5.95	1.89	4.22	1.94	2.34	1.70	2.42
Ac. aspartique	9.11	7.58	8.51	7.33	9.17	8.37	9.88	8.09	20.33	49.95	45.55
Thréonine	4.59	3.03	4.72	3.10	4.75	3.75	4.17	3.61	3.24	3.97	1.51
Sérine	8.52	8.35	7.43	7.96	7.59	8.87	4.64	10.14	6.48	5.60	4.56
Ac. glutamique	13.70	15.20	13.15	14.96	12.15	15.20	11.25	14.85	3.69	5.37	21.43
Proline	5.08	10.60	7.79	8.41	6.40	6.16	8.77	4.37	9.20	4.20	4.96
Glycine	8.14	7.09	8.65	7.70	8.71	8.92	7.66	8.82	5.89	3.43	2.51
Alanine	7.03	5.91	7.15	6.36	7.66	6.82	7.07	7.12	5.57	4.83	2.08
Valine	4.94	5.20	3.65	5.97	3.23	4.60	3.22	3.40	2.74	2.87	1.39
Méthionine	2.09	0.83	2.00	1.94	2.18	1.67	1.58	2.01	0.80	1.01	0.95
Isoleucine	4.66	3.50	4.43	3.69	4.82	4.26	4.64	4.24	3.33	2.73	1.23
Leucine	6.96	6.28	7.43	6.60	7.19	6.08	6.60	6.13	5.21	3.19	5.04
Tyrosine	3.14	3.84	3.00	4.21	3.04	3.70	2.59	3.93	2.11	1.23	2.55
Phénylalanine	3.13	2.88	2.86	3.15	3.37	3.28	3.12	3.62	2.56	1.12	1.94
Total ($\mu\text{M}/100$ individus)	1725.3	9513.9	1594.9	9791.0	1671.5	9472.8	2783.6	7828.4	5493.0	1628.0	1263.3

Endosp.: endospermes; Cotyl.: cotylédons; Hypocot.: hypocotyles.

l'importance quantitative de l'arginine, de l'acide glutamique, de l'acide aspartique et de la proline se retrouve chez ces deux espèces. La prépondérance qu'acquiert l'acide aspartique, notamment par rapport à l'acide glutamique, est un autre trait commun aux deux Conifères.

CONCLUSIONS

L'arginine constitue un acide aminé important de la composition azotée des graines et des plantules du pin des Canaries. Cette espèce est ainsi comparable à plusieurs autres conifères: *Pinus sylvestris* [1], *P. thunbergii* [15], *P. pinea* [2, 3, 6], *Picea excelsa* [1, 2], *Abies pectinata* [1], *A. nordmanniana* [2].

Il est probable que, compte tenu des résultats acquis pour les fractions azotées soluble, insoluble, et aminée protéique, comme pour le pin pignon [6], l'arginine libre (également détectée sous cette forme chez le pin des Canaries) provienne de l'hydrolyse des protéines riches en cet acide aminé. Mais l'étude des protéases n'a pu être réalisée, pour l'instant, chez le pin des Canaries.

Bien que l'arginine puisse être utilisée de diverses manières dans le métabolisme azoté des végétaux, cet acide est le plus souvent impliqué dans le cycle de Krebs et Henseleit. L'existence de ce cycle a donc été recherchée chez le pin des Canaries.

EXPERIMENTAL

Les graines utilisées pour ce travail ont été sélectionnées par la Station de Recherches Forestières de Rabat. Elles proviennent de la région de Meknes et ont été récoltées en 1974 et 1975. Elles ont été conservées à 4°. Leurs caractéristiques moyennes sont regroupées dans Tableau 1.

Les conditions d'imbibition et de germination ont été déterminées. La présence d'ions Hg et Cl permet d'obtenir une

germination plus rapide, comme dans le cas du pin d'Alep [9].

Les graines imbibées sont placées dans des boîtes de Pétri, sur du papier filtre humecté d'une solution de KCl à 0.3%. Elles sont entreposées dans une chambre de culture, dans des conditions contrôlées de température, de lumière et d'humidité. Les germinations obtenues sont régulières et reproductibles.

Lorsque la radicule atteint une longueur de 3 cm, les jeunes plantules sont transplantées dans des récipients qui contiennent un mélange de sable siliceux et de galets. Le sable et les galets ont été préalablement lavés par HCl concentré, rincés plusieurs fois et stérilisés. La culture est réalisée en présence de la même solution de KCl à 0.3%. Les plantules, homogènes et vigoureuses, sont récoltées après 30 jours de culture. Les cotylédons sont colorés en vert intense par la chlorophylle et aucune trace de carence n'est perceptible. Les réserves minérales et azotées de la graine sont visiblement suffisantes pour assurer une croissance normale de la plantule jusqu'à ce stade, dans les conditions expérimentales utilisées.

Cinq stades de développement ont été retenus pour constituer 5 échantillons, dont les caractéristiques sont données dans le Tableau 1.

Les différents échantillons sont lavés à l'eau distillée, séchés sur papier filtre, puis placés dans des récipients bouchés hermétiquement et entreposés au congélateur, à -18° .

Le matériel végétal peut être utilisé sous cette forme, pour l'extraction des différentes enzymes. Mais pour les dosages de la fraction 'azote total', les échantillons doivent être délipidés à l'acétone, desséchés en présence de Cl_2Ca anhydre et pulvérisés finement.

Les composés azotés sont minéralisés suivant la méthode de Kjeldahl, en présence d'un catalyseur au sélénium. La fraction 'azote soluble' est dosée suivant la même technique, après extraction des composés azotés solubles à partir des échantillons frais.

Les acides aminés protéiques sont obtenus par hydrolyse du résidu d'extraction des composés azotés solubles de chaque échantillon, par HCl 6 N. L'hydrolyse est réalisée en tubes scellés, à 110° , pendant 24 hr. Après évaporations et concentration les acides aminés protéiques sont dosés à l'analyseur automatique, suivant la méthode de Spackman *et al.* [14]. Le tryptophane n'a pas été recherché.

BIBLIOGRAPHIE

1. Schulze, E. (1896) *Z. Physiol. Chem.* **22**, 435.
2. Mothes, K. (1929) *Planta* **7**, 585.
3. Klein, G. et Taubock, K. (1932) *Biochem. Z.* **251**, 10.
4. Krebs, H. A. et Henseleit, K. (1932) *Z. Physiol. Chem.* **210**, 33.
5. Naylor, A. W. (1959) in *Utilization of Nitrogen and its Compounds by Plants*. Symposia of the Society for Experimental Biology, no. XIII, pp. 193–209. University Press, Cambridge.
6. Guitton, Y. (1964) *Physiol. Vég.* **2**, 95.
7. (a) Durzan, D. J. (1968) *Can. J. Botany* **46**, 909; (b) *Idem.*, 929; (c) *Idem.*, 921; (d) (1969) *Can. J. Biochem.* **47**, 771; (e) (1973) *Can. J. Botany* **51**, 351; (f) *Idem.*, 1197.
8. Durzan, D. J. et Chalupa, V. (1968) *Can. J. Botany*, **46**, 417.
9. Durzan, D. J., Mia, A. J. et Ramaiah, P. K. (1971) *Can. J. Botany* **49**, 927.
10. Durzan, D. J., Mia, A. J. et Wang, B. S. P. (1971) *J. Botany* **49**, 2139.
11. Durzan, D. J. et Ramaiah, P. K. (1971) *Can. J. Botany* **49**, 2163.
12. Durzan, D. J. et Richardson, R. G. (1966) *Can. J. Biochem.* **44**, 141.
13. Thalouarn, P. (1975) *C.R. Acad. Sci. Ser. D* **280**, 275.
14. Spackman, D. H., Stein, W. H. et Moore, S. (1958) *Analyt. Chem.* **30**, 1190.
15. Suzuki, U. (1902) *Bull. Coll. Agric., Tokyo Imp. Univ.* **4**, 25.