

INFLUENCE DES NITRATES SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

OUNANE S.M.
Institut National Agronomique
Hassan Badi El Harrach Alger

RESUME

La comparaison des activités glutamine synthétase (GS) et glutamate déshydrogénase (GDH) des feuilles de plantes nodulées ou non-nodulées recevant ou non du nitrate, confirme certaines observations physiologiques et souligne l'intérêt de ces activités enzymatiques comme marqueurs du statut azoté de la plante. Les plantes nodulées ont un comportement similaire aux plantes cultivées sur ammonium comme seule source d'azote. L'activité glutamine synthétase est bien liée à la croissance de la feuille et à l'alimentation nitrique au moins partiellement.

Sur un plan agronomique les résultats que nous avons obtenus en serre montrent que les deux voies d'assimilation de l'azote, minéral et atmosphérique, sont nécessaires pour obtenir un développement maximum en terme de matière sèche, d'azote total accumulé, ou de production de graines. L'azote minéral a pour effet de stimuler la croissance et le développement de l'appareil végétatif tandis que l'azote fixé est détourné vers la production des gousses. Le nitrate réduit la croissance des racines, la nodulation et la fixation. Par contre la nodulation peut limiter l'assimilation du nitrate par la feuille.

De hauts rendements sont accessibles si un bon équilibre de l'alimentation hydrique et de la nutrition azotée est réalisé et le maximum de production de graines est obtenu avec les deux sources d'azote: la fixation et l'assimilation de l'azote.

L'économie d'azote réalisée par la symbiose est à préserver, cependant la recherche d'une participation accrue de la fixation symbiotique ne doit pas masquer la nécessité des apports d'engrais azotés dont l'intensité dépendra des objectifs de rendements. La mesure des activités nitrate réductase, glutamine synthétase et glutamate déshydrogénase peut contribuer à juger de ce bon équilibre azoté de l'appareil végétatif en vue d'une optimisation de la production de graines et de protéines.

Mots clés : Pois chiche, nitrate, nodulation, nutrition azotée.

ABSTRACT

The comparison of activities glutamine synthétase (GS) and glutamate déshydrogénase (GDH) of leaves of plants nodulées or non nodulées receiving or no confirm some physiological observations of the nitrate and underline the interest of this activities enzymatiques as scorers of statute azoté of the plant. Plants nodulées have a similar behavior to plants cultivated on ammonium as only source of nitrogen. The activity glutamine synthétase is bound well less partially to the growth of the leaf and the nitric food.

On an agronomic plan results that we got in greenhouse show that the two ways of nitrogen assimilation, mineral and atmospheric, are necessary to get a maximum development in term of dry matter, of accumulated total nitrogen, or of seed production. The mineral nitrogen has the effect of to stimulate the growth and the development of the vegetative device while the fixed nitrogen is diverted toward the production of pods. The nitrate reduces the growth of roots, the nodulation and the fixing. On the other hand the nodulation can limit the assimilation of the nitrate by the leaf.

High outputs are accessible if a good balance of food hydrique and nitrogenous nutrition is achieved and the maximum of seed production is gotten with the two sources of nitrogen: the fixing and the assimilation of nitrogen.

The economy of nitrogen achieved by the symbiosis is to preserve, however the research of an involvement increased of the symbiotic fixing must not conceal the necessity of manure azotés contributions whose intensity will depend on objectives of outputs. The measure of activities nitrate réductase, glutamine synthétase and glutamate déshydrogénase can contribute to judge this good balance azoté of the vegetative device in view of an optimization of the production of seeds and proteins.

Key words : Chickpea, nitrate, nodulation, nutrition nitrogenous.

INTRODUCTION

L'influence de l'azote minéral sur la fixation biologique de l'azote a fait l'objet de nombreuses études qui ont mis en évidence une relation complexe entre la plante-hôte, la souche de *Rhizobium* utilisée, la forme ou la teneur de l'azote combiné, la période d'application et l'environnement (HARPER et GIBSON, 1983).

L'effet du nitrate se traduit par une action inhibitrice à un stade précoce en empêchant l'induction des nodosités et leur développement (GIBSON et PAGAN, 1977). Parmi les différentes hypothèses qui ont été formulées pour expliquer ce phénomène on peut retenir l'inhibition indirecte du nitrate sur la croissance des nodosités ainsi que sur leur activité par la réduction de l'accumulation des sucres à l'intérieur de celles-ci (LATIMORE et al., 1977); l'inhibition directe de la synthèse des lectines qui assurent l'adsorption des bactéries sur les poils absorbants (DAZZO et BRILL, 1978; DENARIE et TRUCHET, 1979); l'accélération de la destruction de l'AIA, hormone qui contrôle la courbure des poils absorbants et l'infection des racines (MUNNS, 1968).

Le nitrate du sol peut provoquer plus tard une diminution de l'activité fixatrice de la nodosité (OGHOHORIE et PATE, 1971). Les fortes teneurs en ammonium inhibent aussi l'activité nitrogénase, soit par une inhibition de la synthèse de la nitrogénase (DILWORTH, 1966; BETHLENFALVAY et al., 1978), soit par une baisse de la teneur en léghémoglobines susceptible de limiter l'activité nitrogénase des nodosités (BISSELING et al., 1978).

La diminution de la fixation de l'azote atmosphérique par le nitrate chez les légumineuses pourvues de nodosités efficaces est largement connue, même si elle ne semble pas générale. En effet à faibles doses on peut observer un effet bénéfique sur la fixation et même sur la nodulation, lorsque l'application du nitrate a lieu avant la nodulation (McNEIL, 1982). Par contre l'inhibition pourrait résulter, soit d'un détournement d'ATP et du pouvoir réducteur pour la nitrate réductase (MAHART et WONG, 1979), soit de l'accumulation de nitrite dans les nodosités (STEPHENS et NEYRA, 1983). Dans ce dernier cas le nitrite bloquerait sous forme inactive, soit la léghémoglobine, soit la nitrogénase (TRINCHANT et RIGAUD, 1982).

L'action bénéfique du nitrate, à faible dose, sur la symbiose s'expliquerait par un meilleur état physiologique de la plante dû à une stimulation de la photosynthèse (JATIMLIANSKY et al., 1982), particulièrement en début du cycle de développement de la plante, lorsque l'azote cotylédonaire est épuisé et la fixation inexistante ou encore faible (LARRY et al., 1981).

Un apport d'azote combiné (NH_4 et/ou NO_3) à concentration égale, montre que l'ion ammonium a un effet inhibiteur moins élevé que l'ion nitrate sur la nitrogénase (KIMOU *et al.*, 1985). L'urée au contraire est sans effet sur la fixation de l'azote (HAIRPER et NICHOLAS, 1976).

Les données disponibles révèlent qu'une très grande attention a été portée sur l'effet de l'azote combiné sur la fixation de l'azote moléculaire. Réciproquement, on dispose de moins d'informations sur l'influence de la nodulation sur l'aptitude du végétal à assimiler le nitrate. Or, au cours du cycle végétatif les deux voies de nutrition azotée jouent des rôles complémentaires (SALSAC *et al.*, 1984). Les modifications de l'équilibre dans la contribution de ces deux sources d'azote dans la plante peuvent avoir d'importantes implications sur l'efficacité du métabolisme azoté.

MATERIEL ET METHODES

La connaissance des interactions entre l'assimilation du nitrate et la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique, passe obligatoirement par l'étude des activités enzymatiques susceptibles de servir de critère du métabolisme azoté de la plante. Nous avons mesuré les activités nitrate réductase et nitrogénase qui indiquent l'évolution de l'aptitude du végétal à utiliser l'une ou l'autre voie de la nutrition azotée. Nous avons suivi aussi les activités glutamine synthétase et glutamate déshydrogénase des feuilles, enzymes considérées comme les marqueurs des deux voies possibles d'incorporation de l'ammonium. Cette dernière approche, nous a paru intéressante pour voir dans quelle mesure la fixation symbiotique, source d'azote réduit pour les parties aériennes, est susceptible de contrôler les activités GS et GDH.

L'essai a été réalisé en serre dans des pots avec un substrat composé de sable de rivière. Les plantules de pois chiche (ILC3279) issues de la germination des graines au laboratoire sont repiquées en pots, puis inoculées avec une souche fournie par l'ICRISAT (IC2018).

Dès la germination jusqu'à l'apparition de la première feuille, les plantes sont arrosées quotidiennement avec une solution nutritive sans azote, complétée avec KNO_3 1 mM. Ce dernier est indispensable aux plantes pour démarrer leur croissance.

A l'apparition de la première feuille trois traitements sont effectués:

- N: Les plantes non-inoculées sont arrosées quotidiennement avec une solution nutritive contenant 4 meq/l de nitrate.
- N+F: Les plantes inoculées sont arrosées quotidiennement avec une solution nutritive contenant 4 meq/l de nitrate.
- F: Les plantes inoculées sont arrosées quotidiennement avec une solution nutritive dépourvue d'azote.

La fixation de l'azote est estimée par la mesure de l'activité de réduction de l'acétylène (ARA) par la méthode de BALANDREAU *et al.* (1971). Elle est effectuée sur plante entière et exprimée en $\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$.

L'assimilation de l'azote combiné du sol (nitrate) est déterminée par la mesure de l'activité nitrate-réductase (ANR) sur la première feuille entièrement formée de la plante et par la méthode *in-situ* de ROBIN *et al.* (1983). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{M NO}_2/\text{h/g}$ poids frais.

L'activité glutamine synthétase est évaluée par la formation de glutamyl hydroxamate en présence d'hydroxylamine suivant la technique de O'NEAL *et JOY* (1973).

L'activité glutamate déshydrogénase est mesurée d'après la méthode JOY (1973) mise au point par TIRADO (1987).

RESULTATS ET DISCUSSION U

1.- Effet des nitrates et de la nodulation sur la croissance

Durant la première phase, de l'émergence jusqu'au début de la floraison, qui correspond à la période d'établissement des nodosités, les plantes N+F accumulent plus de matière sèche dans les feuilles et les tiges que les

plantes N. Ces dernières accumulent à leur tour plus de matière sèche dans les feuilles et dans les tiges que les plantes qui ne reçoivent pas d'azote minéral F (figure 1b et c). Cette observation se retrouve aussi au niveau de la première feuille, dont le poids sec à maturité est supérieur dans les traitements N et N+F par rapport au traitement F (figure 1a).

Durant la même période, la croissance en matière sèche des racines est plus importante chez les plantes nodulées N+F et F que chez les plantes qui reçoivent exclusivement de l'azote minéral N (figure 1d).

Quand les plantes atteignent le stade gousse, l'effet de la source d'azote sur l'accumulation de matière sèche des parties aériennes est particulièrement marqué: 50% de plus chez les plantes N que chez les plantes F et presque 100% de plus chez les plantes N+F. Cet effet varie selon l'organe étudié (tableau 1).

L'effet de l'azote minéral est particulièrement remarquable sur la partie aérienne et notamment sur les tiges. Les plantes cultivées exclusivement avec l'azote minéral N ont une croissance supérieure de 100% pour les feuilles et pour les tiges que les plantes nodulées sans azote minéral F. Par contre le poids des gousses n'est pas différent dans les deux traitements (Tableau 1).

Il ressort de ces résultats que l'azote minéral participe à la croissance et le développement de l'appareil végétatif tandis que l'azote fixé est mobilisé surtout pour la production des gousses. Les plantes nodulées investissent proportionnellement davantage dans la production des gousses que les plantes non Xnodulées tandis que les plantes alimentées avec de l'azote minéral investissent proportionnellement plus dans la production de l'appareil végétatif . DART et al. (1977) ont en effet montré que l'augmentation de la concentration du nitrate dans le milieu de culture, réduit progressivement l'élongation des racines et la formation des poils absorbants chez *Medicago*. Des résultats analogues ont aussi été observés chez le maïs, l'épinard et l'oignon (HEINS et SCHENK, 1986). D'autres travaux ont montré l'existence d'une variabilité génétique parmi les cultivars pour le nombre et le poids sec des nodules (PAZDERNIK et al. 1996, 1997; SINCLAIR et al., 1991).

Tableau 1 : Répartition de la matière sèche au stade gousse dans les différents organes de plantes inoculées au stade gousse (Moyenne de 4 répétitions)

Organe	Matière sèche g/plante		
	Fixation(f)	Fixation + Azote (F+N)	Azote (N) ppds 0,05
Feuilles (F)	21,23	45,11	42,45
Tiges (T)	15,25	35,45	30,24
F+ T	36,48	80,56	78,21
Gousses (G)	18,87	32,5	18,54
F+T+ G	55,35	113,06	96,75
G / F+T+G	0,34	0,29	0,19

2.- Effet des nitrates et de la nodulation sur la fixation symbiotique de l'azote

Chez les plantes nodulées F et N+F, l'activité nitrogénase (ARA) suit la même évolution jusqu'au 60^e jour au delà duquel se fait sentir l'effet du nitrate (figure 5). Au stade floraison nous observons une forte diminution de l'ARA chez les plantes N+F.

L'inhibition moyenne par l'azote minéral sur l'ensemble des mesures faites entre le début de la floraison et le stade gousse est de 64%. Ces résultats rejoignent ceux observés par KIMOU (1984) et KIMOU *et al.* (1985) qui observent que des doses supérieures à 3 meq de nitrate par litre inhibent la croissance des nodules et l'activité nitrogénase. Ils ne font que rejoindre les nombreuses observations citées dans la littérature sur le phénomène bien connu de l'inhibition de la nodulation et de la fixation par l'azote minéral (DENARIE et TRUCHET, 1979; TRINCHANT et RIGAUD, 1982; KIMOU *et al.*, 1985; SERRAJ et SINCLAIR, 1998).

Au delà du 60^{me} jours l'effet est moins évident. Il est vraisemblable que les nodules qui ne fonctionneraient pas à leur optimum à ce stade (OUNANE, 1994), n'interfèrent que très peu sur le métabolisme azoté (D'AVIES *et al.*, 2000).

3.- Effet des nitrates et de la nodulation sur l'activité nitrate réductase.

Bien qu'évoluant de façon similaire dans les deux traitements contenant du nitrate (N et N+F), l'activité NR moyenne par gramme de matière fraîche des feuilles est nettement plus faible chez les plantes N+F que chez les plantes N (entre le tiers et la moitié), particulièrement pendant la première phase où se situe le pic d'activité (figure 2a). Cette tendance s'observe aussi sur la teneur en nitrate dans les feuilles (figure 2b).

Si, comme certains auteurs l'ont montré, le flux du nitrate vers la partie aérienne contrôle l'activité NR (TALOUIZTE *et al.*, 1984; SOUALMI-BOUDJEMAA *et al.*, 1985) cela signifie que la nodulation affecte l'absorption et/ou le transport du nitrate, de sorte que l'activité NR et la teneur en nitrate sont plus faibles chez les plantes nodulées N+F que chez les plantes non nodulées N. Par contre, la croissance des racines pendant la même période est relativement plus faible chez les plantes N que chez les plantes nodulées (F et N+F). On peut donc supposer que pendant cette période d'établissement des nodules, les photosynthétats sont détournés vers la partie racinaire (figure 1d). Ce qui a pour conséquence un effet positif sur la croissance en matière sèche des racines et des nodules mais peut limiter la capacité d'absorption du nitrate (WYCH *et RAINS*, 1978) en modifiant la structure du système racinaire (plus trapu) et par voie de conséquence le flux du nitrate qui commande la synthèse et le fonctionnement de la nitrate réductase. Si le nitrate limite la nodulation et la fixation de l'azote, la nodulation peut donc limiter l'assimilation du nitrate par la feuille.

4.- Effet des nitrates et de la nodulation sur l'activité glutamine synthétase

Au cours du développement de la première feuille, l'activité GS atteint son maximum après l'activité NR. Elle est affectée positivement par l'azote minéral (figure 3a). L'activité GS des plantes N, exprimée par gramme de

matière fraîche est largement supérieure à celle des plantes F, différence qui disparaît plus tard lorsque la feuille devient sénescente. On observe une légère différence entre les traitements N et N+F, différence qui disparaît lorsque l'activité GS est exprimée par organe (figure 2b).

L'effet positif du nitrate sur l'activité GS déjà signalé par différents auteurs (RHODES et *al.*, 1976; LOYOLA et SANCHEZ, 1986), indique que cette enzyme est liée à l'assimilation du nitrate dans la feuille. De plus la présence dans les chloroplastes de la nitrite réductase (qui catalyse la réduction du nitrite en ammonium), de la glutamine synthétase (responsable de la synthèse de glutamine à partir du glutamate et de l'ammonium) ainsi que de la glutamate synthétase (qui catalyse la synthèse de 2 glutamates à partir de la glutamine et l' α -cétoglutarate) a fait suggérer à LEA et MIFLIN (1974), que l'incorporation de l'ammonium provenant de la réduction du nitrate dans la glutamine et le glutamate est réalisé dans les chloroplastes. Ces derniers vont à leur tour fournir l'azote à la totalité des acides aminés nécessaires à la synthèse protéique (MIFLIN et LEA, 1980).

La diminution de l'activité glutamine synthétase chez les plantes nodulées privées d'azote minéral peut être attribuée (comme pour l'activité nitrate réductase) à une diminution de l'absorption et/ou du transport du nitrate ainsi qu'à une diminution de la croissance de la partie aérienne au détriment du bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique. En effet JATIMLIANSKY et *al.* (1982) ont montré que la teneur en chlorophylle et la photosynthèse nette sont déprimées chez les plantes nodulées sans apport de nitrate.

Le fait que les plantes nodulées recevant de l'azote minéral ont une activité GS semblable à celles des plantes non nodulées, nous indique que la nodulation n'a pas un effet dépressif direct sur l'activité GS.

5.- Effet des nitrates et de la nodulation sur l'activité glutamate déshydrogénase

L'activité GDH augmente régulièrement au cours du développement de la feuille et atteint son activité maximale chez la feuille sénescente. Aux stades les plus avancés du développement de la feuille on observe une augmentation plus prononcée dans les feuilles de plantes nodulées privées d'azote minéral (F) (figure 4a). 1X

Cette observation est confirmée avec l'activité moyenne de l'ensemble des feuilles au cours de leur développement (figure 4b).

L'effet positif de la privation d'azote minéral sur l'activité GDH ne peut être associé qu'à une accélération de la sénescence, provoquée par une mauvaise nutrition azotée.

L'augmentation de l'activité GDH pourrait donc être une caractéristique du vieillissement foliaire. Une telle augmentation de l'activité GDH pendant la sénescence a déjà été observée chez les plantes supérieures (LAURIERE et DAUSSANT, 1983 ; CAMMAERTS et JACOBS, 1985).

CONCLUSION

Il ressort de ces résultats que l'azote minéral participe à la croissance et au développement de l'appareil végétatif tandis que l'azote fixé est mobilisé surtout pour la production des gousses. Les plantes nodulées investissent proportionnellement davantage dans la production des gousses que les plantes non nodulées tandis que les plantes alimentées avec de l'azote minéral investissent proportionnellement plus dans la production de l'appareil végétatif.

La diminution de l'activité glutamine synthétase chez les plantes nodulées privées d'azote minéral peut être attribuée (comme pour l'activité nitrate réductase) à une diminution de l'absorption et/ou du transport du nitrate ainsi qu'à une diminution de la croissance de la partie aérienne au détriment du bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique.

Les plantes nodulées recevant de l'azote minéral ont une activité GS semblable à celles des plantes non nodulées et de ce fait, nous pouvons penser que la nodulation n'a pas un effet dépressif direct sur l'activité GS.

L'activité GDH augmente régulièrement et atteint son activité maximale chez la feuille sénescente. L'augmentation de l'activité GDH pourrait donc être une caractéristique du vieillissement foliaire.

L'effet positif de la privation d'azote minéral sur l'activité GDH ne peut être associé qu'à une accélération de la sénescence, provoquée par une mauvaise nutrition azotée.

Si l'on compare les résultats des activités GS et GDH des feuilles de plantes soumises aux différents traitements, il est possible de tirer une conclusion qui confirme certaines observations physiologiques et souligne l'intérêt de ces activités enzymatiques comme marqueurs du statut azoté de la plante. L'activité glutamine synthétase est bien liée à la croissance de la feuille et à l'alimentation nitrique, au moins partiellement.

En général, les activités nitrate réductase et nitrogénase paraissent antagonistes et leur pic maximum se succèdent au cours du cycle de développement de la plante. Par contre nos résultats obtenus en serre montrent que les activités nitrate réductase et nitrogénase augmentent parallèlement à la croissance des plantes jusqu'à la fin de la floraison puis chutent au moment du remplissage des gousses. Des résultats semblables ont été obtenus chez le soja par KIMOU (1984), en assurant un apport régulier de nitrate au cours du cycle de développement.

La disparité de ces observations doit être attribuée à la complexité des facteurs qui régulent ces deux enzymes et qui fluctuent au cours de la vie de l'association symbiotique. La présence simultanée de ces deux activités suggère que dans certaines conditions lorsque l'énergie disponible est suffisante et l'apport de nitrate continu, les activités nitrate réductase et nitrogénase ne sont pas antagonistes.

Le processus d'assimilation du nitrate dans les molécules organiques est exigeant en énergie, pouvoir réducteur et substrats carbonés. Il concurrence le fonctionnement des nodosités pour la fourniture en photosynthétats. L'inhibition de la fixation d'azote observée dès que l'alimentation nitrique est importante peut s'expliquer par un détournement des photosynthétats utilisés pour la réduction et l'assimilation du nitrate au détriment de l'approvisionnement nodulaire.

Sur un plan agronomique les résultats que nous avons obtenus en serre montrent que les deux voies d'assimilation de l'azote sont nécessaires pour obtenir un développement maximum en terme de matière sèche,

d'azote total accumulé ou de production de graines. L'azote minéral a pour effet de stimuler la croissance et le développement de l'appareil végétatif tandis que l'azote fixé est surtout destinée à la production de gousses. Les plantes nodulées investissent proportionnellement davantage dans la production des gousses que les plantes non nodulées et les plantes nourries avec de l'azote minéral investissent proportionnellement plus dans la production de l'appareil végétatif. Le nitrate réduit la croissance des racines, la nodulation et la fixation. De même la nodulation peut limiter l'assimilation du nitrate par la feuille.

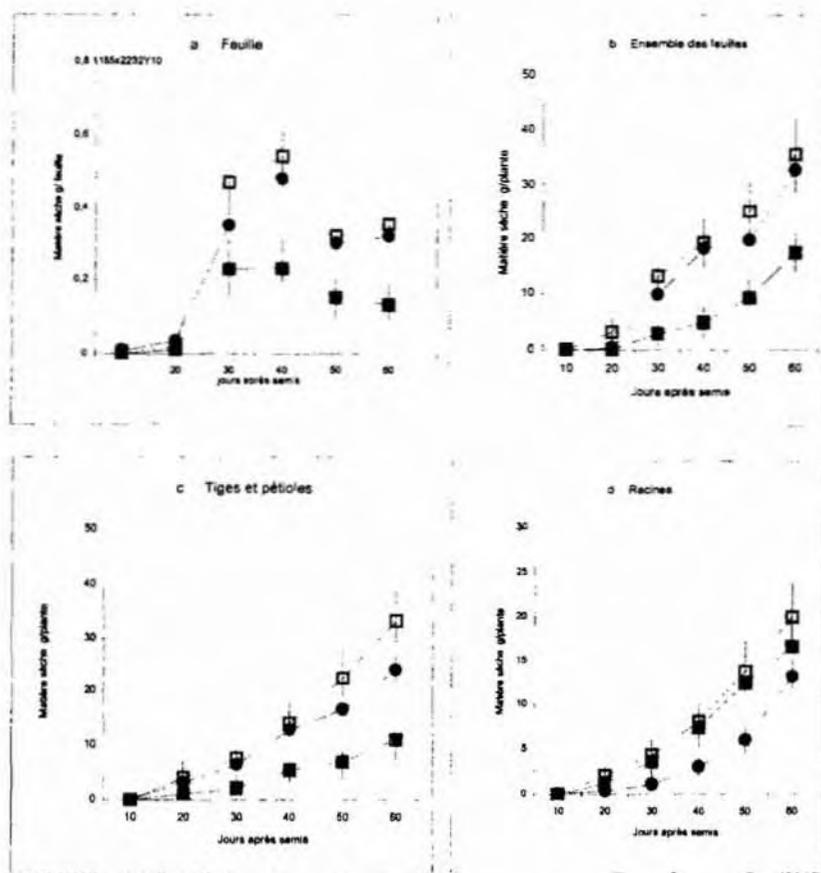


Figure 1 : Evolution de la matière sèche de la feuille (a) de l'ensemble des feuilles (b), des tiges et pétioles (c) et des racines (d) de plantes inoculées et recevant de l'azote minéral (□) inoculées uniquement (■), recevant de l'azote uniquement (●)

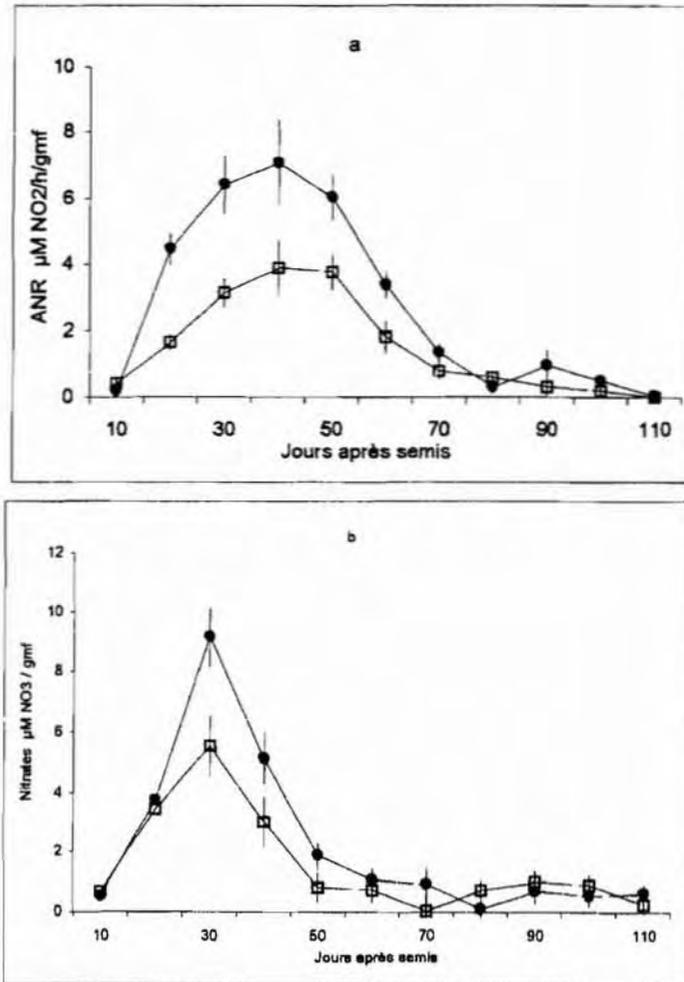


Figure 2 : Evolution de l'activité nitrate réductase (a) et de la teneur en nitrate (b) des feuilles de plantes inoculées recevant de l'azote minérale (□) ou recevant de l'azote uniquement (●)

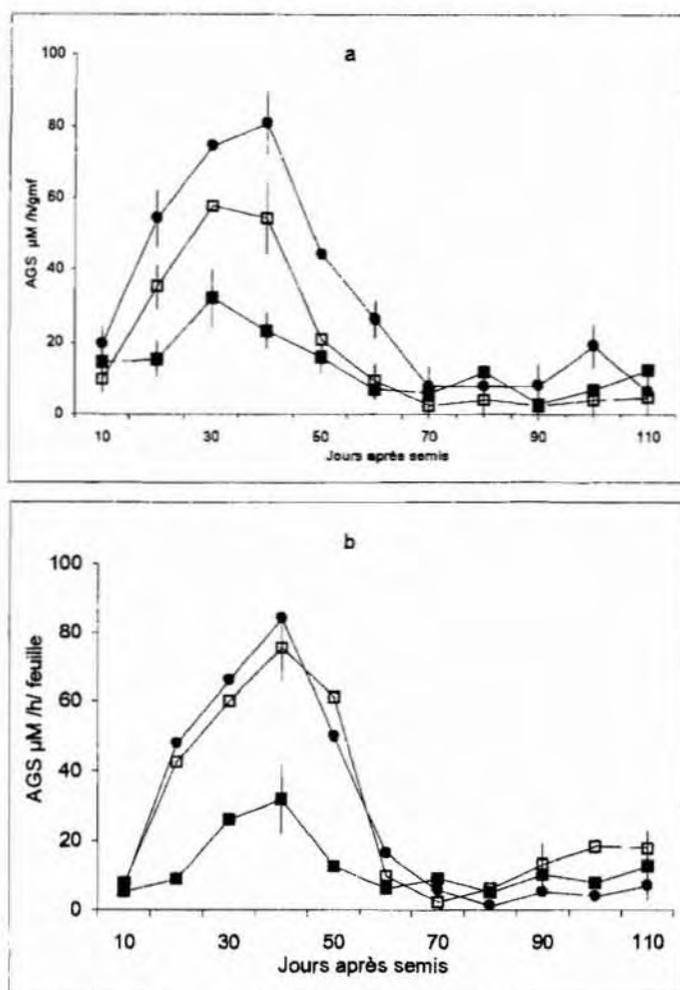


Figure 3 : Effet de l'inoculation et de l'azote minéral sur l'AGS de plantes inoculées et recevant de l'azote minéral (□), inoculées uniquement (■), recevant de l'azote uniquement (●)

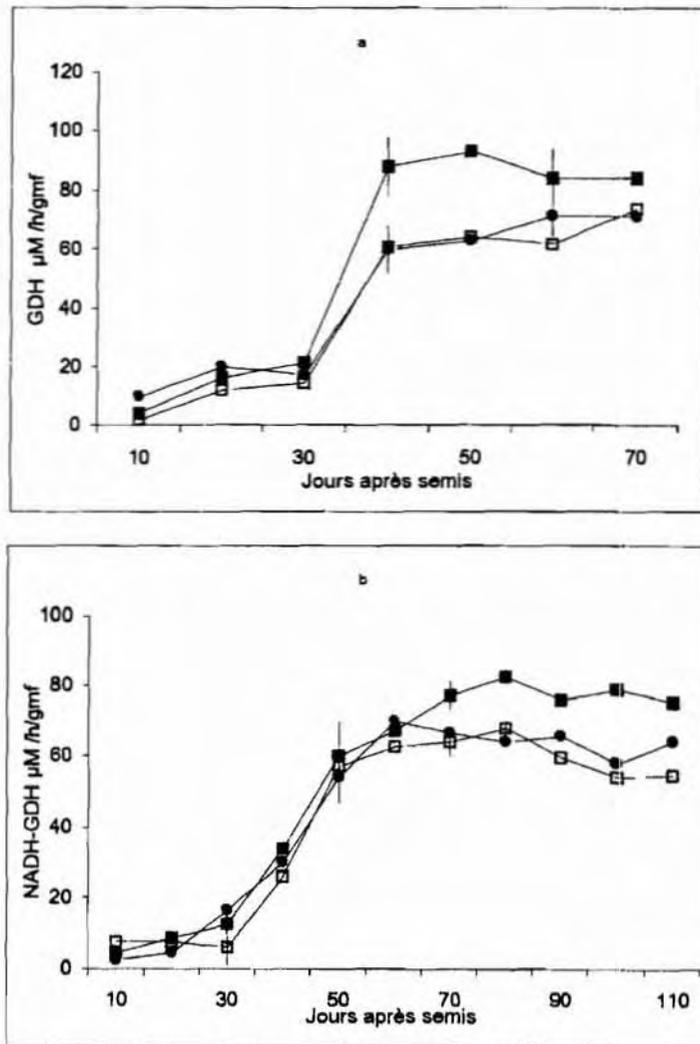


Figure 4 : Evolution de l'AGDH par feuiklle (a) par l'ensemble des feuilles (b) de plantes inoculées et recevant de l'azote (□), inoculées uniquement (■), recevant de l'azote uniquement (●)

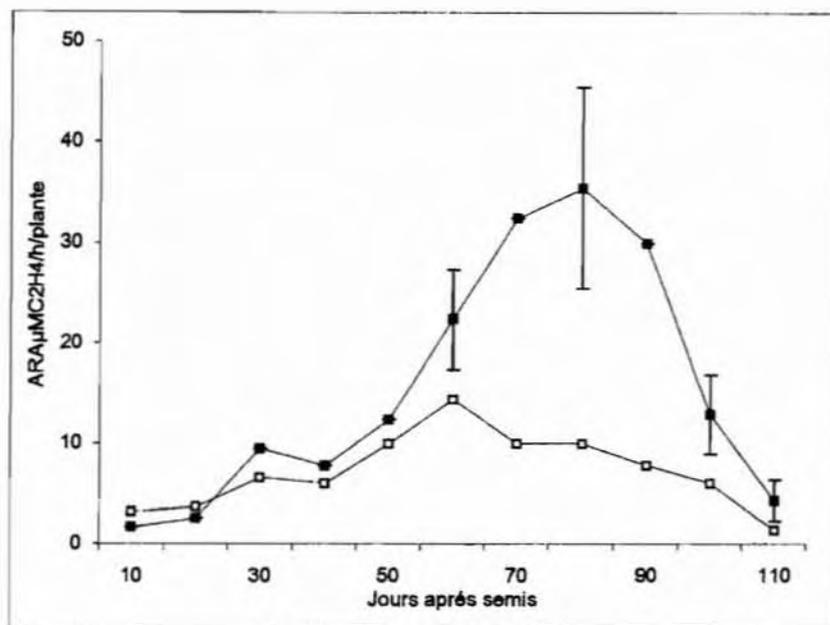


Figure 5 : Evolution de l'activité nitrogénase de plantes inoculées et recevant l'azote minéral (□), inoculées uniquement (■)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BALANDREAU J., DOMERGES Y., 1971.-** Mesure in situ de l'activité nitrogénase. C.R.Acad.Sci.Paris, 273, 2020-2023.
- BETHLENFALVAY G.S., ABU-SHAKRA S.S., PHILLIPS D A., 1978.-** Interdependence of nitrogen fixation and photosynthesis in *Pisum sativum* L. I. Effects of combined nitrogen on symbiotic nitrogen fixation and photosynthesis. Plant Physiol., 62, 127-130.
- BISSELING T., VAN DEN BOS B.C. , VAN KAMMEN A., 1978.-** The effect of ammonium on the synthesis of nitrogenase and the concentration of leghemoglobin in pea root nodules induced by *Rhizobium leguminosarum*. Bioch. Biophys Acta, 539, 1-11.
- CAMMAERTS D. , JACOBS M., 1985.-** A study of the polymorphism and the genetic control of the glutamate dehydrogenase isozymes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci. Lett., 31, 65-73.
- DART P.J., HUXLEY P.A., EAGLESHAM A.R., MINCHING F.R., SUMMERFIELD R.J., DAY J.M., 1977.-** Nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*). II Effects of inorganic nitrogen on growth and yield of nodulated and non-nodulated plants. Expl. Agric., 13, 241-252.
- DAVIES C. L., TURNER D. W., DRACUP M., 2000.-** Yellow lupin (*Lupinus luteus*) tolerates waterlogging better than narrow-leaved lupin (*L. angustifolius*) I. Shoot and root growth in a controlled environment. Aust. J. Agric. Res., 51, 701-709.
- DAZZO F.B., BRILL W.J., 1978.-** Regulation by fixed nitrogen of host symbiont recognition in the *Rhizobium* clover symbiosis. Plant. Physiol., 62, 18-21.
- DENARIE J., TRUCHET G., 1979.-** La symbiose Rhizobium-légumineuse: rôles respectifs des partenaires. Physiol. Vég., 17, 643_67.
- DILWORTH M.J., 1966.-** Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. Biochem. Biophys. Acta. , 127, 285-294.

- GIBSON A.H., PAGAN J.D., 1977.-** Nitrate effects on the nodulation of legume inoculated with nitrate reductase deficient mutants of *Rhizobium*. *Planta*, 134, 17-22.
- HARPER J.C., GIBSON A.H., 1983.-** Nitrate inhibition of nodulation among soybean cultivar x *Rhizobium* strains combinations. *Plant Physiol.*, 71, 157-163
- HARPER J.E. NICHOLAS J.C., 1976.-** Control of nutrient solution pH with an ion exchange system. Effect on soybean nodulation. *Physiol. Plant.*, 38, 24-28.
- HEINS B., SCHENK M., 1986.-** Nitrate-uptake characteristics of root as affected by nitrate supply. in. *Developments in plant and soils sciences: fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants*. Eds. H.L. Lambers, J.J. Neetensen et I. Stulen; Mactinus Nijhoff publishers pp 45.
- JATIMLIANSKY J.R., CHAMPIGNY M.L, PRIOUIL J.L, BISMITH E., MOYSE A., 1982.-** Influence du nitrate sur la croissance et la photosynthèse nette du Soja pourvu ou non de nodosités. *Physiol. Vég.*, 20, 407-422.
- JOY R.W., 1973.-** Control of glutamate dehydrogenase for *Pisum sativum* roots. *Phytochemistry*, 12, 1031-1040.
- KIMOU A. 1984.** Influence de l'azote combiné et du recyclage de l'hydrogène sur l'activité et l'efficacité relative dans la symbiose *Glycine max-Rhizobium japonicum*. Thèse de Docteur Ingénieur. ENSAM, Montpellier, France.
- KIMOU A., DREVON J.J., SALSAC L., 1985.-** Effets de l'azote combiné sur l'efficacité relative apparente de la nitrogénase chez le soja. *Physiol. Vég.*, 23(3), 249-256.
- LARRY E.W., DEJORN T.M., PHILLIPS D.A., 1981.-** Carbon and nitrogen metabolism of soybean seedling development. *Plant. Physiol.*, 68, 1206-1209.
- LATIMORE M., GIDDENS J.R., ASHLEY D.A., 1977.-** Effect of ammonium and nitrate nitrogen upon photosynthetate supply and nitrogen fixation by soybean. *Crop Sci.*, 17, 399-404.

- LAURIERE C., DAUSSANT J., 1983.-** Identification of the ammonium dependent isoenzyme of glutamate dehydrogenase as the form induced by senescence or darkness stress in the first leaf of wheat. *Physiol. Plant.*, 58, 89-92.
- LEA P.J., MIFLIN B.J., 1974.-** An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, 251, 614-616.
- LOYOLA V.V.M., SANCHEZ J.E., 1986.-** Effect of nitrate, ammonium and glutamine on nitrogen assimilation enzymes during callus growth of maize. *Plant Physiol.*, 125, 235-242.
- MAHART J.B., WONG P.P., 1979.-** Nitrate reductase activities of *Rhizobium* and the correlation between nitrate reduction and nitrogen fixation. *Can. J. Microbiol.*, 25, 1169-1174.
- McNEIL, D.L., 1982.-** Variations in ability of *Rhizobium japonicum* strains to nodulate soybean and maintain fixation in the presence of nitrate. *Appl. Envir. Microbiol.*, 44, 647-652.
- MIFLIN B.J., LEA P.J., 1980.-** Ammonia assimilation. In *The Biochemistry of Plants*, vol. V, Stumpf P.K. et Conn E.E., Eds., Academic Press, New York, pp202.
- MUNNS D.N., 1968.-** Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. I Acid sensitive step. *Plant and Soil*, 28, 129-146.
- OGHOGHORIE C.C.O., PATE J.J., 1971.-** The nitrate stress syndrome of the nodulated pea (*Pisum arvense* L) Technic for measurements and evaluation in physiological terms. *Plant and Soil*, special volume, 185-202.
- O'NEAL D., JOY R.W., 1973.-** Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization and pH optima. *Arch. Biochem. Biophys.*, 159, 113-122.
- OUNANE S.M., 1998.-** Effet du stress hydrique sur la fixation et l'assimilation de l'azote chez le pois chiche. *Annales de l'Institut National Agronomique El Harrach*, 19, 1 et 2, 114-124.
- PAZDERNIK D. L., GRAHAM P. H., VANCE C. P., ORF J. H., 1996.-** Host genetic variation in the early nodulation and dinitrogen fixation of soybean. *Crop Sci.*, 36, 1102-1107.

- RHODES D., BENDON G.A., STEWART G.R., 1976.**- The regulation of ammonia assimilating enzymes in *Lemna minor*. *Planta*, 129, 203-210.
- ROBIN P., CONEGERO G., PASSAMA L., SALSAC L., 1983.**- Evolution de la fraction métabolisable du nitrate par la mesure *in situ* de sa réduction. *Physiol.Vég.*, 21, 123-128.
- SALSAC L., DREYON J.J., ZENGBE M., CLEYET-MAREL J.C., OBATON M., 1984.**- Energy requirement of symbiotic N₂ fixation. *Physiol. Vég.*, 22(4), 509-521.
- SERRAJ R., SINCLAIR T. R., 1998.**- Soybean cultivars variability for nodule formation and growth under drought. *Plant and soil*, 202, 159-166.
- SINCLAIR T.R., SOFFES A.R., HINSON K., ALBRECHT S.L., PFAHLER, 1991.**- Genotypic variation in soybean nodules number and weight. *Crop Sci.*, 31, 301-304.
- SOUALMI-BODJEMAA, MOYSE A., CHAMPIGNY M.L., 1985.**- Modulation of nitrate reductase in wheat shoot and roots by nitrate. *Physiol. Vég.*, 23(5), 869-875.
- STEPHENS B.D., NEYRA C.A., 1983.**- Nitrate and nitrite reduction in relation to nitrogenase activity in soybean nodules and *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.*, 71, 731-735.
- TALOUIZTE A., GUIRAUD G., MOYSE A. MORAL C., CHAMPIGNY M.L., 1984.**- Effect of previous nitrate deprivation on ¹⁵N-nitrate absorption and assimilation by wheat seedlings. *J. Plant Physiol.*, 116, 113-122.
- TIRADO J.L., 1987.**- Contribution à l'étude des activités glutamine synthétase et glutamine deshydrogénase comme marqueurs du métabolisme azoté chez la feuille de soja. Thèse doctorat, Université de Montpellier, pp201.
- TRINCHANT J.C. et RIGAUD J., 1982.**- Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 1385-1388.
- WYCH R.D., RAINS D.W., 1978.**- Simultaneous measurement of nitrogen fixation estimated by acetylen-etylene assay and nitrate absorption by soybean. *Plant Physiol.*, 62, 443-448.