

## Effet de NaCl sur la croissance et la respiration racinaire du triticale (*X-Triticosecale* Wittmack)

Najoua Bouraoui, Claude Grignon, Ezzeddine Zid

Dans de nombreuses régions du monde, la salinité est une contrainte majeure qui limite la productivité agricole [1]. Identifier et comprendre les mécanismes de la tolérance des plantes à ce facteur présente un intérêt potentiel évident dans une optique d'aide à l'amélioration variétale. NaCl inhibe la croissance racinaire des glycophytes, qu'elles soient réputées très sensibles à la salinité [2], moyennement sensibles [3, 4], ou plutôt tolérantes [5]. Néanmoins, cette inhibition est généralement moins marquée que celle des parties aériennes [6, 7].

La racine reçoit par le phloème les assimilats produits dans les feuilles, peu de temps après leur biosynthèse. Chez le blé, la défoliation entraîne en moins de 90 minutes une baisse des sucres solubles et de la respiration de l'apex racinaire, ainsi qu'un ralentissement de l'élongation [8]. Le flux descendant de glucides et l'accumulation des sucres réducteurs dans la racine contrôlent l'intensité respiratoire de cet organe [9, 10] ainsi que sa croissance [11]. Deux

types de respiration peuvent être distingués : la respiration liée à la croissance et la respiration d'entretien qui fournit l'énergie nécessaire au maintien des structures cellulaires et au déroulement des transports ioniques [12]. C'est elle qui prédomine en conditions de contraintes environnementales fortes. Il a été montré que la respiration des racines de *Ficus indica*, exposées à NaCl 100 mmol, est plus élevée que celle des racines témoins, tandis que la croissance racinaire est diminuée [13]. La respiration racinaire de la variété tolérante d'orge California Mariot augmente de 50 % en présence de NaCl ou KCl 10 mmol, alors que la respiration de la variété Arivat, sensible au sel, est doublée [14].

Une proportion élevée des assimilats transférés aux racines stressées semble être utilisée dans les processus énergétiques nécessaires à l'ajustement osmotique aux fortes salinités. Toutefois, les réponses métaboliques de douze espèces ne montrent pas de stimulation de la respiration racinaire par le sel, sauf pour les racines du pois [15]. Chez la tomate [16], le soja [17], le maïs [18] et le plantain [19], on observe une diminution de la respiration racinaire en présence de sel tandis que, chez d'autres espèces, la respiration est insensible au sel [20].

Le triticale présente une tolérance notable à la salinité, et ses racines conservent, en présence de sel, une bonne aptitude à assurer la nutrition minérale de la plante [21-24]. Dans le but de mieux comprendre le rôle du système racinaire

du triticale dans la tolérance au sel, nous avons étudié l'effet de NaCl sur la croissance et le métabolisme respiratoire de la racine pendant les 15 premiers jours qui suivent la germination, phase qui correspond à la mise en place rapide du système végétatif.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal et conditions de culture

Des plantules de triticale (*X-Triticosecale* Wittmack), âgées de 3 jours (stade 1 feuille émergée du coléoptile), sont cultivées sur des cristallisoirs de 2 litres contenant une solution nutritive liquide. Le milieu de base contient des macro-éléments (en mmol) : K<sup>+</sup> (1,5) ; Ca<sup>2+</sup> (1,75) ; Mg<sup>2+</sup> (0,5) ; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (4) ; H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (0,5) ; HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (0,25) ; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (0,5) ; et des oligo-éléments (en ppm) : Fe (1,4) ; Mn (0,25) ; B (0,16) ; Cu (0,03) ; Zn (0,03) ; Mo (0,01). Ce milieu est éventuellement complété par NaCl, de manière à obtenir des concentrations comprises entre 50 et 200 mmol. L'addition de NaCl est faite progressivement à raison de 50 mmol par jour afin de minimiser le choc osmotique. Les milieux de culture sont aérés en permanence et renouvelés tous les 3 jours. La photopériode est de 16 h et l'intensité lumineuse de 40 W/m<sup>2</sup>. L'humidité relative et la température sont respectivement de 55 % et 30 °C le jour, et de 90 % et 22 °C la nuit.

N. Bouraoui, E. Zid : Laboratoire de physiologie et écophysiologie végétales, Faculté des sciences de Tunis, Campus universitaire, 1060 Tunis, Tunisie.

C. Grignon : Biochimie et physiologie moléculaire des plantes. INRA, CNRS (URA 2133), École nationale supérieure agronomique, place Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France.

Tirés à part : N. Bouraoui

## Mesures de la croissance

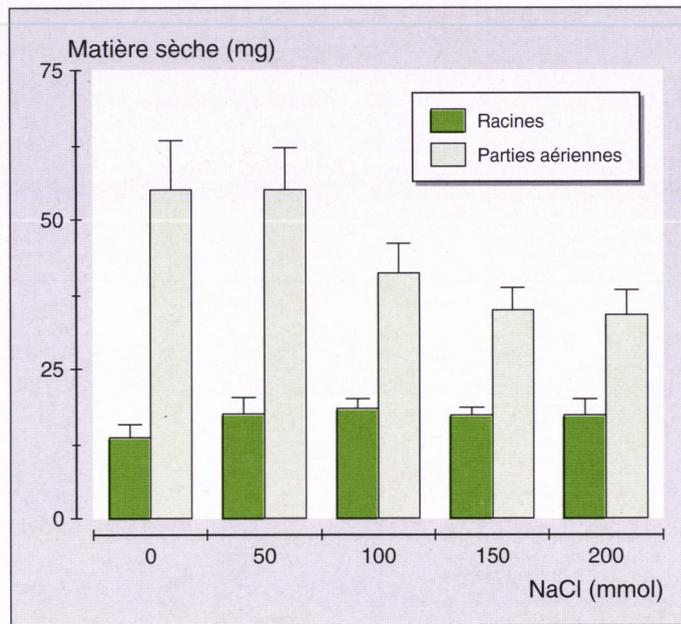
Les mesures de biomasse sont faites sur des plantules témoins âgées de 4 jours, avant l'application de NaCl. Après 11 jours de culture, les racines et les parties aériennes sont séparées, séchées à 80 °C pendant 48 h, puis pesées. La production nette de biomasse pendant la culture est calculée par la différence entre les valeurs finales et les valeurs initiales de la matière sèche. Les vitesses d'élongation racinaire et foliaire sont déterminées en boîtes de Pétri sur des germinations de 2 à 4 jours sur une solution nutritive contenant ou non NaCl 100 mmol. La plupart des plantules présentent à ce stade trois racines séminales de 1 à 2,5 cm de longueur. L'élongation racinaire est suivie pendant 4 jours par un marquage à l'encre de Chine effectué à 2 mm de l'apex.

Les mesures de consommation d'oxygène sont faites par polarographie sur des segments de racines, à l'aide d'une cellule de Clark (Hansatech). Les racines sont découpées en segments de 8 à 10 mm dans les régions apicale, médiane ou basale. Les segments sont introduits dans la cellule de mesure contenant 2 ml du milieu témoin complet additionné ou non de NaCl (100 à 200 mmol). Une jaquette à circulation d'eau permet de thermostatier la cellule de mesure à 26 °C. Le milieu est agité à l'aide d'un barreau aimanté, séparé des segments racinaires. Cette agitation maintient les segments en suspension et homogénéise le milieu au voisinage de la membrane en téflon et de l'électrode situées dans la partie inférieure de la cellule de mesure. Nous avons vérifié que l'excision des segments n'interfère pas avec l'effet étudié (stimulation de la respiration par NaCl), en utilisant un respiromètre de Warburg et des racines entières. Les intensités respiratoires sont exprimées par rapport à la matière fraîche. On sait par ailleurs que les traitements salins ne modifient pas la teneur en eau des racines.

## Résultats

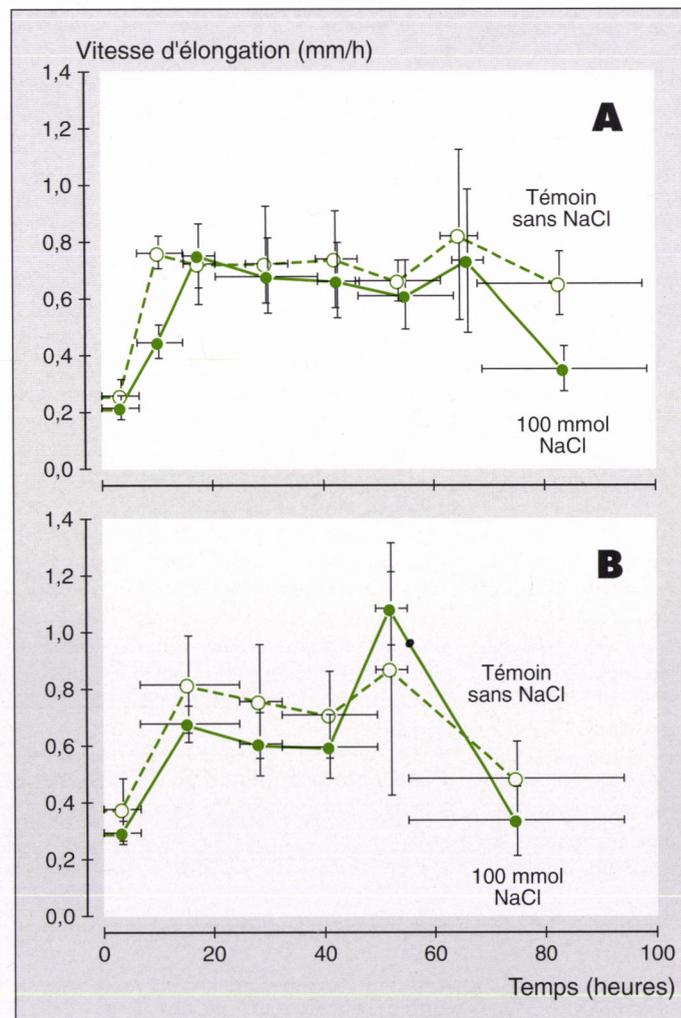
### Croissance

Nous avons mesuré la production de biomasse de matière sèche de plantules âgées de 15 jours, cultivées depuis 11 jours en présence de NaCl à différentes concentrations. La *figure 1* montre que NaCl



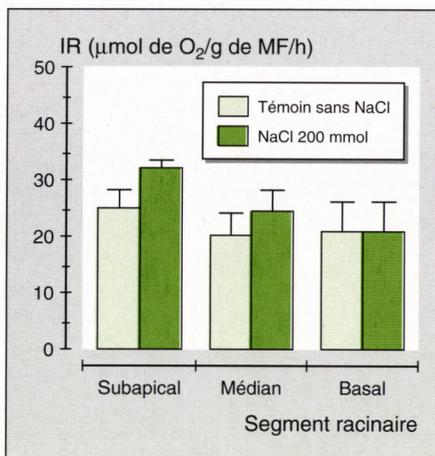
**Figure 1.** Effet de NaCl sur la croissance des racines et des parties aériennes de plantules de triticale âgées de 14 jours, après 11 jours de culture (moyennes de 17 mesures individuelles et intervalles de confiance au seuil de 5 %).

**Figure 1.** Effect of NaCl on shoot and root growth in 14 day-old triticale plantlets after 11 days culture (means of 17 measurements; 5 % confidence interval).



**Figure 2.** Effet de NaCl (100 mmol) appliqué à 2 jours (A) ou 4 jours (B) après la germination, sur la vitesse d'élongation racinaire de triticale (moyennes de 9 mesures et intervalles de confiance au seuil de 5 %).

**Figure 2.** Effect of NaCl (100 mM) applied 2 days (A) or 4 days (B) post-germination on the root elongation rate in triticale (means of 9 measurements; 5 % confidence interval).



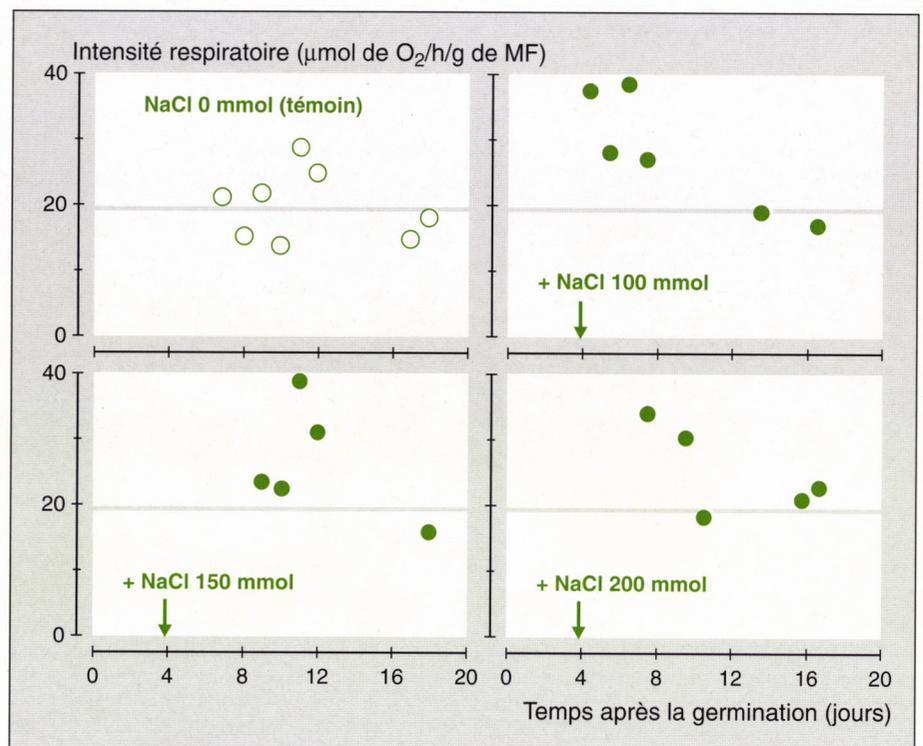
**Figure 3.** Variation de l'intensité respiratoire le long des racines de triticale (moyennes de 6 mesures correspondant chacune à un lot de segments racinaires prélevés d'une même plante. Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %).

**Figure 3.** Variations in the O<sub>2</sub> uptake rate along triticale roots (means of 6 measurements obtained from separate batches of root segments cut from the same plant; 5 % confidence interval).

50 mmol n'affecte pas la croissance des parties aériennes ni celle des racines. Pour des concentrations plus élevées, un effet dépressif du sel se manifeste au niveau des parties aériennes, mais non dans les racines où la biomasse racinaire est même légèrement augmentée par rapport au témoin. Les concentrations 100 et 200 mmol induisent une baisse de croissance des parties aériennes, mais une bonne tolérance des racines. L'élongation des zones apicales entre 2 et 8 jours après la germination est insensible à NaCl 100 mmol pendant les 72 premières heures de traitement, puis diminue. Chez les plantules âgées de 4 jours au moment de l'application du sel, des résultats similaires sont obtenus (figure 2).

## Respiration

Les plantes sont cultivées pendant 15 jours sur milieu témoin, additionné ou non de NaCl 200 mmol. Les racines sont divisées en trois : la zone sub-apicale (de 0,5 à 3,5 cm au-dessus de l'apex), la zone médiane (de 3,5 cm au-dessus de l'apex à 8 cm au-dessous du collet), et la zone basale (de 8 cm à 1 cm sous le grain). Chaque mesure de consommation d'oxygène est faite sur un lot de segments provenant de la même plante. Sur milieu témoin (figure 3), les intensités respiratoires des trois zones s'étalent de 16 à 27 μmol de O<sub>2</sub>/h/g de matière fraîche (MF). En présence de NaCl, on observe une augmentation de 25 à 30 % de la respiration de la



**Figure 4.** Variation de l'intensité respiratoire racinaire de triticale en fonction de l'âge des plantes cultivées et de la concentration en NaCl (la ligne horizontale donne la valeur moyenne de l'intensité respiratoire mesurée en l'absence de NaCl entre 7 et 21 jours : panneau supérieur gauche ; la flèche indique le moment d'addition de NaCl).

**Figure 4.** O<sub>2</sub> uptake rate in triticale roots as a function of plant age and NaCl concentrations (the horizontal line in the upper left panel represents the mean respiration rate measured in the absence of NaCl after 7-21 days growth ; the arrow shows when NaCl was added to the medium).

partie apicale et de la partie médiane. Cet effet, qui ne s'observe pas dans les parties basales, est hautement significatif dans la partie sub-apicale ( $\tau = 5,06$  pour  $t_{0,01} = 3,06$ ). L'effet du sel sur la respiration est transitoire : des racines prélevées sur des plantules de différents âges montrent que NaCl (100 à 200 mmol) stimule dans un premier temps l'absorption de O<sub>2</sub> dans des segments médians de racines, mais cet effet ne dure pas après une dizaine de jours en présence de NaCl (figure 4). Ce caractère transitoire pourrait caractériser soit une phase de sensibilité dans le développement des jeunes plantes, soit une phase initiale

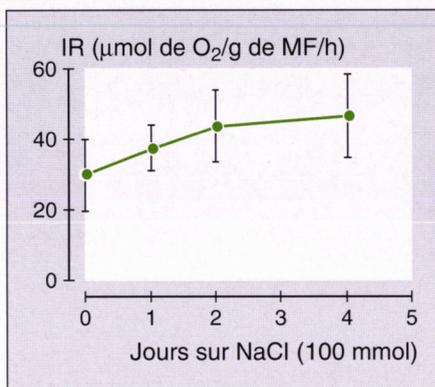
de la réponse au sel, selon que les facteurs en cause sont l'âge des plantes ou le temps de culture en présence de NaCl. Pour discriminer ces deux hypothèses, nous avons mesuré la respiration de racines de plantes de même âge (9 jours) cultivées en présence de NaCl depuis 1, 2 ou 4 jours. Des plantules sont repiquées sur milieu témoin après 3 jours de germination sur eau distillée. Après 24 h, les plantules sont divisées en quatre lots : un lot témoin et trois lots à une concentration finale de 100 mmol de NaCl appliquée selon le protocole décrit dans le tableau. La respiration est mesurée chez des plantules âgées de 9 jours.

## Tableau

### Protocole d'application du sel (mmol)

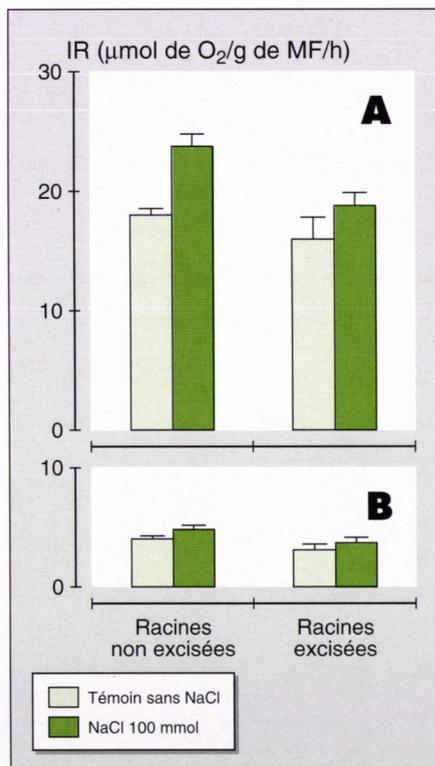
	1 <sup>er</sup> jour	2 <sup>e</sup> jour	3 <sup>e</sup> jour	4 <sup>e</sup> jour
Lot 1	25	50	75	100
Lot 2	0	0	50	100
Lot 3	0	0	0	100

### Salt treatment procedure



**Figure 5.** Effet de la durée du traitement par NaCl 100 mmol, sur l'intensité respiratoire des segments apicaux de racines de plantules de triticale âgées de 8 jours (moyennes des mesures sur 4 plantes et intervalles de confiance au seuil de 5 %).

**Figure 5.** Effect of the duration of NaCl treatment on the O<sub>2</sub> uptake rate in apical segments of triticale roots of 9 day-old plantlets (means of 4 measurements ; 5 % confidence interval).



**Figure 6.** Effet de l'excision de la moitié du nombre de racines sur la respiration des apex racinaires (A) et foliaires (B) de triticale (moyennes de 20 mesures pour les plantes entières et 9 mesures pour les plantes excisées, intervalles de confiance au seuil de 5 %).

**Figure 6.** Effect of pruning half of the triticale root system on root apex (A) and leaf base (B) respiration (means of 20 measurements for leaves and roots of whole plants, and 9 measurements for those from excised plants ; 5 % confidence interval).

## Summary

### Effect of NaCl on root growth and root respiration in triticale (*X-Triticosecale* Wittmack)

N. Bouraoui, C. Grignon, E. Zid

*Triticale displays high tolerance to salinity. Roots of this plant can ensure mineral nutrition even when NaCl is present in the medium at relatively high concentration. We studied the effects of salt on root growth and respiration in triticale seedlings grown in liquid synthetic medium supplemented with 50-200 mM NaCl. Leaf biomass production decreased, but not that of roots (Figure 1). The root elongation rate was determined by the displacement of Indian ink marks in the subapical zone. It was insensitive to 100 mM NaCl (Figure 2). To identify the factors responsible for root-growth maintenance (or in some cases stimulation) in the presence of NaCl, we measured respiration in root segments with a Clark electrode, both in the presence and absence of NaCl. In 15 day-old seedlings treated for 11 days with NaCl, root respiration was 25-30% stimulated in apical and median regions, but not in basal regions (Figure 3). This stimulation appeared after 1 day of NaCl treatment and was maximum after 4 days (Figure 5). However, it was transient and disappeared after 10 days of continuous NaCl treatment (Figure 4). This stimulation could result from an increased availability of assimilates transported to the roots, in response to the reduced demand for shoot growth. To check this hypothesis, we pruned half of the root system in order to increase the shoot/root ratio. Salt-induced stimulation of root respiration was still observed after this treatment (Figure 6). It is concluded that root respiration was not limited by assimilate allocation. The increased energetic demand for NaCl-induced growth can be met by the root metabolism, and this could therefore be a determining factor of triticale tolerance to salinity.*

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 372-6.

L'intensité respiratoire croît d'environ 30 à 45 µmol de O<sub>2</sub>/h/g de MF lorsque le temps passé au contact de NaCl varie de 0 à 4 jours (figure 5). Elle est significativement différente entre plantes témoins et plantes sur sel pendant 4 jours ( $t = 2,57$  pour  $t_{0,05} = 2,45$ ). Cette augmentation de la respiration dépend du temps passé en présence de NaCl et non de l'âge des plantes.

### Effets de la modification du rapport parties aériennes/racines sur la respiration racinaire et foliaire

Après 4 jours de culture sur milieu nutritif enrichi ou non avec NaCl, le système racinaire de plantules de 8 jours est réduit par excision d'une racine sur deux au niveau du grain. Ceci permet d'augmenter artificiellement d'un facteur 2 le rapport des biomasses parties aériennes/racines (PA/R). La respiration des segments apicaux des racines restées en place (de même que celle des régions basales des feuilles : parties

jeunes à l'intérieur des gaines) est mesurée après 24 h de culture sur milieu témoin ou sur milieu additionné de NaCl 100 mmol. Sur milieu témoin, l'intensité respiratoire des racines est la même, que le système racinaire soit maintenu entier ou réduit de moitié. En présence de NaCl, par contre, la respiration racinaire est stimulée, mais de façon moins marquée quand 50 % des racines sont éliminées (figure 6A). Dans le cas des plantules à système racinaire entier, l'intensité respiratoire des feuilles (qui est de l'ordre de 30 % de celle des racines) est stimulée par le sel (figure 6B). L'excision de la moitié du système racinaire diminue la respiration foliaire, sur milieu témoin comme en présence de NaCl.

## Discussion et conclusion

Le NaCl n'inhibe ni la production de biomasse ni la vitesse d'élongation racinaire du triticale. En présence de NaCl 100 mmol, la respiration est stimulée par rapport au

témoin d'environ 30 % dans la région sub-apicale de la racine et 20 % dans la région médiane de cet organe; elle est sans effet dans la région basale. Ceci pourrait traduire une augmentation du coût énergétique de la régulation ionique [25, 26]. Cette dépense d'énergie liée aux transports semble être particulièrement marquée dans les racines, dont le contact direct avec le sol facilite les pertes d'ions, qui doivent continuellement être réabsorbées (processus représentant de 25 à 50 % du coût respiratoire du transport des ions [27]). La respiration racinaire est plus élevée dans la zone d'élongation [28] où la densité des mitochondries est plus élevée [29]. Le passage des cellules du stade de division au stade d'élongation s'accompagne d'une modification du métabolisme respiratoire [28].

L'augmentation de la respiration dans les racines de triticales en présence de NaCl peut correspondre soit à un besoin énergétique accru de la nutrition minérale et hydrique (hypothèse 1), soit à une disponibilité accrue de substrats respiratoires libérés par le ralentissement de la croissance des parties aériennes (qui se traduit par une baisse du rapport de la biomasse des parties aériennes sur la biomasse des racines) (hypothèse 2). L'augmentation artificielle de ce rapport PA/R n'augmente ni la respiration des feuilles ni celle des racines restantes, que ce soit en présence ou en absence de NaCl. Il ne semble donc pas que la quantité d'assimilats produits soit limitante par rapport à la demande de croissance (dans le cas d'une telle limitation, la suppression d'une large fraction d'organes consommateurs d'assimilats devrait entraîner une meilleure alimentation des organes restants). Par conséquent, l'hypothèse 2 ci-dessus paraît moins plausible que l'hypothèse 1. On peut supposer que le maintien de la vitesse d'élongation de la racine de triticales en présence de NaCl (figure 2) se fait au prix d'une augmentation de la consommation énergétique de la racine. Ceci expliquerait que l'augmentation de la respiration des extrémités de racines soit précisément observée dans la zone d'élongation cellulaire. Le maintien de la croissance racinaire et la stimulation de la respiration sur milieu salé semblent correspondre à l'un des facteurs de tolérance du triticales à la salinité ■

#### Remerciements

Ce travail a bénéficié du concours de l'Agence universitaire de la Francophonie (Aupelf-Uref). Le Professeur Jean-Claude Davidian (ENSA Montpellier) est vivement remercié pour son aide.

#### Références

1. Neumann P. Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant Cell Environ* 1997; 20: 1193-7.
2. Nakamura Y, Tanaka K, Ohta E, Sakata M. Protective effect of external  $Ca^{2+}$  on elongation and the intracellular concentration of intact mung bean roots under high NaCl stress. *Plant Cell Physiol* 1990; 31: 815-21.
3. Cramer GR, Epstein E, Läuchli A. Kinetics of root elongation of maize in response to short-term exposure to NaCl and elevated calcium concentration. *J Exp Bot* 1988; 39: 1513-22.
4. Snapp SS, Shennan C. Effects of salinity on root growth and death dynamics of tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *New Phytol* 1992; 121: 71-9.
5. Zhong H, Lauchli A. Spatial distribution of solutes, K, Na, Ca and their deposition rates in the growth zone of primary cotton roots: effects of NaCl and  $CaCl_2$ . *Planta* 1994; 194: 34-41.
6. Greenway H, Munns R. Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Ann Rev Plant Physiol* 1980; 31: 149-90.
7. Munns R, Termaat A. Whole-plant responses to salinity. *Aust J Plant Physiol* 1986; 13: 143-60.
8. Bingham IJ, Panico A, Stevenson EA. Extension rate and respiratory activity in the growth zone of wheat roots: time-course for adjustments after defoliation. *Physiol Plant* 1996; 98: 201-9.
9. Saglio PH, Raymond P, Pradet A. Metabolic activity and energy charge of excised maize root tips under anoxia. *Plant Physiol* 1980; 66: 1053-7.
10. Cheeseman JM, Enkoji C. Proton efflux from roots of intact *Spergularia marina* plants. *J Exp Bot* 1984; 35: 1048-52.
11. Aguirrezabal LAN, Deleens E, Tardieu F. Root elongation rate is accounted for by intercepted PPF and source-sink relations in field and laboratory-grown sunflower. *Plant Cell Environ* 1994; 17: 443-50.
12. Penning de Vries FWT. Use of assimilate in the higher plants. In: J. Cooper, ed. *Photosynthesis and productivity in different environments*. Cambridge: Cambridge Univ Press, 1975: 459-80.
13. Gersani M, Agraaham EA, Nobel PS. Growth responses of individual roots of *Opuntia ficus-indica* to salinity. *Plant Cell Environ* 1993; 16: 827-34.
14. Bloom A, Epstein E. Varietal differences in salt-induced respiration in barley. *Plant Sci Lett* 1984; 35: 1-3.
15. Nieman RH. Some effects of sodium chloride on the growth, photosynthesis and respiration of twelve crop plants. *Bot Gaz* 1962; 123: 279-85.
16. Taleisnik EL. Salinity effects on growth and carbon balance in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Physiol Plant* 1987; 71: 213-8.
17. Béjaoui M. Effets du NaCl sur l'élongation, la géoréaction et l'absorption d'oxygène de segments apicaux de racines de soja (*Glycine max* L.). *Physiol Vég* 1980; 18: 737-47.
18. Yeo AR, Flowers TJ. Salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) and pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. *Aust J Plant Physiol* 1986; 13: 163-73.

19. Lambers H, Blacquiere T, Stuijver BCEE. Interactions between osmoregulation and the alternative respiratory pathway in *Plantago coronopus* as affected by salinity. *Physiol Plant* 1981; 51: 63-8.

20. Lambers H. Efficiency of root respiration in relation to growth, morphology and soil comparison. *Physiol Plant* 1979; 46: 194-202.

21. Bizid E, Zid E, Grignon C. Tolérance à NaCl et sélectivité  $K^+/Na^+$  chez les triticales. *Agronomie* 1988; 8: 23-7.

22. François LE, Donovan TJ, Maas EV, Rubenthaler GL. Effect of salinity on grain yield and quality, vegetative growth and germination of triticales. *Agr J* 1988; 80: 642-7.

23. Gorham J. Salt tolerance in the triticeae: ion discrimination in Rye and Triticales. *J Exp Bot* 1990; 41: 609-14.

24. Bouraoui N. *Analyse des facteurs responsables de la tolérance au stress salin chez une céréale hybride, le Triticales: croissance, nutrition et métabolisme respiratoire*. Thèse de Spécialité, Université de Tunis, 1995; 193 p.

25. Livne A, Levin N. Tissue respiration and mitochondrial oxidative phosphorylation of NaCl-treated pea seedlings. *Plant Physiol* 1966; 42: 407-14.

26. McCree KJ, Kallsen CE, Richardsons SG. Carbon balance of *Sorghum* plants during osmotic adjustment to water stress. *Plant Physiol* 1984; 76: 898-902.

27. Bouma TJ, de Visser R. Energy requirements for maintenance of ion concentrations in roots. *Physiol Plant* 1993; 89: 133-42.

28. Béjaoui M, Pilet PE. Oxygen uptake of growing and geostimulated roots. *Plant Sci Lett* 1977; 8: 223-6.

29. Miller RS, Bell DT, Koeppel DE. The effects of water stress on some membrane characteristics of corn mitochondria. *Plant Physiol* 1971; 48: 229-35.

## Résumé

L'application de NaCl (50 à 200 mmol) à des plantules de triticales cultivées sur milieu synthétique liquide restreint la production de biomasse des parties aériennes, mais non celle des racines. La vitesse d'élongation de ces dernières est insensible au sel (100 mmol); elle est même dans certains cas stimulée. La respiration de segments médians et apicaux de racines est également stimulée par le sel (+ 25 à 30 %) même si l'on accroît d'un facteur 2 le rapport parties aériennes/racines. Ces résultats montrent que la demande énergétique de la croissance est augmentée en milieu salé et que le métabolisme respiratoire racinaire du triticales répond à cette demande.