

# Application de la chromatographie en phase gazeuse à l'étude de l'exsudation racinaire du riz

Marc BOUREAU

O.R.S.T.O.M., Dakar, B.P. 1386, Sénégal.

## RÉSUMÉ

*Une méthode originale d'obtention et de fractionnement des exsudats racinaires est décrite. La chromatographie en phase gazeuse permet de doser les produits formés avec une précision variant entre  $10^{-5}$  et  $10^{-9}$  grammes.*

MOTS CLÉS : Chromatographie - exsudats - riz - techniques.

## ABSTRACT

*An original method of production and separation of root exudates is described.*

*The formed products are analysed by gas liquid chromatography. The accuracy of this method vary between  $10^{-5}$  and  $10^{-9}$  g, according to the nature of products.*

KEY WORDS : Gaz chromatography - rice exudates - technics.

## INTRODUCTION

Dans la rhizosphère les microorganismes utilisent pour leur croissance la matière organique du sol, les débris racinaires, les produits du métabolisme microbien, et les produits organiques exsudés par les racines des plantes. Il semble que ces derniers soient le facteur prépondérant de l'effet rhizosphère (Macura, 1966-1971).

L'exsudation est liée à l'activité métabolique de la plante, donc aux différents facteurs de l'environnement. L'étude de ce phénomène nécessite non seulement l'utilisation de techniques d'analyses fines mais aussi la réalisation de dispositifs expérimentaux permettant de contrôler l'environnement et de recueillir une quantité suffisante de produits formés.

Des recherches systématiques sur les exsudats racinaires ont été réalisées au moyen de techniques chromatographiques mono et bi-dimensionnelles sur papier, sur couches minces ou sur résines (Rovira, 1959; Rivière, 1960; Vancura, 1964; 1965; 1967; Ayers, 1968; Sadhu, 1971), ou plus récemment sur « Technicon » (Boulter et coll., 1966).

Le marquage radioactif des substances exsudées par l'introduction de  $^{14}\text{CO}_2$  dans les voies métaboliques de la photosynthèse (P. Lespinat, communication personnelle) a permis d'étudier la physiologie de l'exsudation avec beaucoup de précision (McDougall, 1970).

Jusqu'ici très peu d'auteurs ont employé la chromatographie en phase gazeuse pour l'identification et le dosage des composés exsudés par les racines des plantes. Kovacs (1971), l'utilise pour le dosage des molécules aromatiques de pois, coton et orge, et Shay (1970), dose par ce moyen les sucres exsudés par l'arachide.

En ce qui concerne les dispositifs expérimentaux, peu d'auteurs ont travaillé au champ (Ivarson et coll., 1968). La majorité des études a été conduite en milieu minéral axénique (Stotzky et coll., 1962; Claton et coll., 1964; Bend et coll., 1964; Hahn, 1966; Barber, 1967; Richter et coll., 1968), permettant l'obtention d'exsudats en quantité relativement importante.

A partir des nombreux modèles proposés nous avons adapté une technique de culture simple permettant le maintien de la partie racinaire en condition stérile alors que la partie aérienne est à l'air libre. Les produits d'exsudation ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. CULTURE AXÉNIQUE

Les graines de riz (variété IR 8) sont stérilisées sous vide pendant 30 mn dans une solution de  $\text{Ag NO}_3$  à 2 % après avoir été immergées dans l'alcool absolu pendant 20 mn. Ce traitement est suivi d'un rinçage avec une solution de  $\text{NaCl}$  à 1 % et plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile (Kovacs, 1971).

La germination se fait dans des fioles cylindroconiques de 100 ml au fond desquelles on a coulé un milieu gélosé à 5 g/l contenant par litre 5 g de

glucose, 2,5 g d'extrait de levure et 0,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et destiné à mettre les contaminants éventuels en évidence.

Au bout de quatre à cinq jours, les plantules sont transférées stérilement dans les pots de culture. Ceux-ci sont constitués de flacons de Keller de 350  $\text{cm}^3$  à deux tubulures latérales. L'ouverture du flacon est surmontée d'un tube de verre en deux parties séparables (fig. 1). Une grille en acier inoxydable sert de support aux plantules et le haut du tube est fermé par un coton cardé. Lorsque la plante atteint le sommet du tube, un joint stérile et hydrofuge est coulé au niveau du collet selon la technique de Stotzky et coll. (1962), ce qui permet le maintien des racines dans les conditions stériles requises pour l'étude de l'exsudation, alors que les feuilles sont libres dans l'atmosphère.

L'évapotranspiration des plantes est compensée régulièrement par un apport d'eau distillée stérile. L'éclairage artificiel est assuré par quatre lampes Mazda MAFD de 400 watts fournissant un éclairage moyen de 30 000 lux avec une photopériode de 12 heures.

Le milieu nutritif utilisé (tabl. I) a été mis au point en tenant compte des travaux effectués sur la nutrition du riz (Karim, 1969) et plus particulièrement sur les besoins en azote (Singh, 1966) et en silice (Okuda, 1965; Takahashi, 1968). L'emploi de substances complexantes a été évité afin de ne pas gêner l'extraction ultérieure des produits exsudés. La silice est ajoutée à raison de 1 g environ par récipient de culture, avant l'introduction stérile du milieu, sous forme de  $2\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , légèrement soluble. Le pH final est de 6,0.

Les récipients sont stérilisés à 120 °C pendant une heure à l'autoclave. La solution nutritive est introduite par filtration à travers un filtre Millipore de 0,22  $\mu$ .

Le milieu contient en outre les oligoéléments suivants : Mn, 0,2 ppm; Cu, 0,02 ppm; Zn, 0,5 ppm; B, 0,1 ppm et Mo, 0,02 ppm.

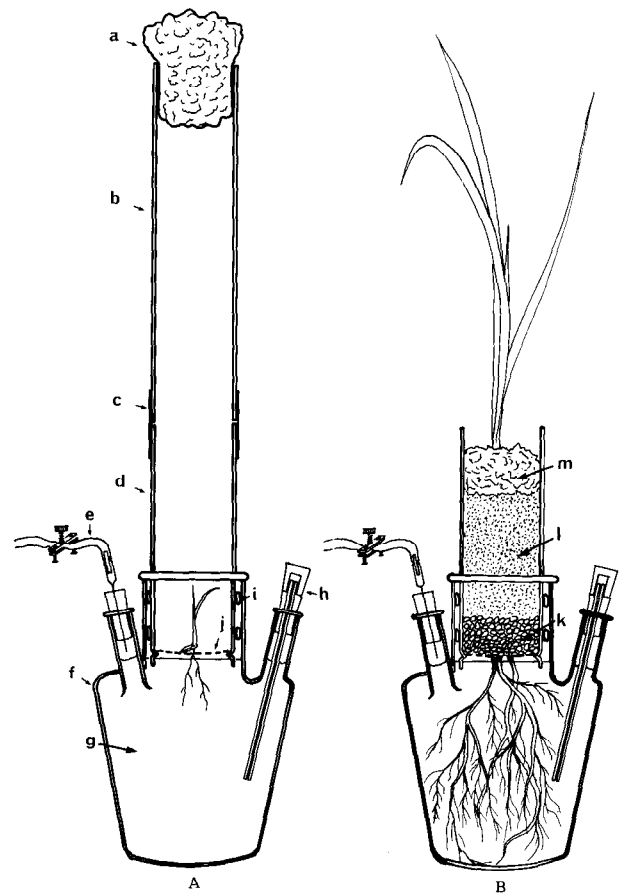


Fig. 1. — A : Début de culture. a : coton cardé. b : tube de prolongation amovible. c : ruban adhésif thermostable. d : tube de prolongation fixe. e : dispositif d'alimentation en eau distillée stérile. f : ballon de Keller de 350 ml. g : solution nutritive. h : dispositif de prélèvement stérile à la seringue. i : joint torique en silicone. j : grille en acier inoxydable. B : fin de culture. K : gravier à arrêtes non coupantes. l : sable hydrofugé. m : coton cardé.

TABLEAU I  
COMPOSITION DU MILIEU NUTRITIF

	grammes/litre	p.p.m.	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,65	Ca = 280	N = 297
$\text{KNO}_3$	0,725	K = 280	
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,06	P = 17	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,49	Mg = 46	S = 62
NaCl	0,085	Na = 34	Cl = 50
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,050	Fe = 10	
$\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,00	Si = $\epsilon$	

## 2. ANALYSE DES PRODUITS D'EXSUDATION

L'originalité de la méthode consiste en une séparation et un dessalage simultanés des trois fractions suivantes : acides aminés, acides organiques et sucres. Chacune des fractions est ensuite analysée séparément.

## 2.1. Fractionnement et dessalage

Les produits de desquamation et les débris racinaires sont éliminés de l'échantillon par passage sur filtre Millipore de 0,45  $\mu$ . On ajoute ensuite les étalons internes qui serviront de référence lors de l'analyse chromatographique : la Nor-leucine pour les acides aminés, l'acide adipique pour les acides organiques et le Xylose pour les sucres, car la présence de ces différents produits est peu probable parmi les exsudats du riz. Ces étalons internes sont introduits à des concentrations voisines de celles qui sont présumées pour les différents composants de l'échantillon concentré (0,1 à 1 mg/l).

L'échantillon de 300 ml environ est ensuite alcalinisé à pH 8 par la soude 1 N, puis concentré sous vide à 40 °C dans un évaporateur rotatif jusqu'à un volume de 40 ml environ. Le pH de la solution concentrée est ajusté à 9.

Les trois fractions sont séparées et dessalées en milieu alcalin en utilisant une seule colonne de résine Dowex 1, anionique forme Cl<sup>-</sup>, de 300-400 mesh; cette technique est une modification de celle de Busch et coll. (1952) qui l'utilisent pour la séparation des acides organiques.

La colonne (10 cm de hauteur sur 1 cm de diamètre) est conditionnée par passage d'une solution 4 M de formiate de sodium jusqu'à disparition des ions Cl<sup>-</sup> dans l'effluent (test au NO<sub>3</sub>Ag), puis lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralité. On fait passer enfin 50 ml d'une solution 6 N d'acide formique et on lave une nouvelle fois à l'eau distillée jusqu'à neutralité de l'effluent.

La solution à analyser est versée sur la colonne d'où elle est éluée au rythme de 1 ml/mn. On rince avec 10 ml d'eau. L'effluent et l'eau de rinçage contiennent la fraction neutre qui sera déminéralisée à travers une colonne de résine cationique Dowex 50, forme H<sup>+</sup> de 200-400 mesh (10 cm de hauteur sur 1 cm de diamètre).

L'éluion sélective des acides aminés s'opère par passage de 30 ml d'une solution 0,1 N d'acide formique à la vitesse de 1 ml/mn. Les acides organiques sont élués par 100 ml d'une solution à 15 % d'acide formique à la vitesse de 5 ml/mn.

## 2.2. Analyses par chromatographie en phase gazeuse

L'appareil utilisé est un Varian Aerograph 1400, monocolonne à détection par ionisation de flamme.

## 2.2.1. Analyse des sucres.

La séparation chromatographique est réalisée après triméthylsilylation par passage, en programmation de température, à travers une colonne de silicone SE 52 (Sweeley et coll., 1963).

L'éluat de la résine cationique est évaporé à sec sous vide à 40 °C. Le résidu est repris par 3 fois 0,5 ml de pyridine anhydre à 80 °C environ et transféré dans un flacon à réaction en pyrex de 5 ml fermé par une membrane en téflon et un bouchon à vis. Les dérivés sont formés par addition de 0,2 ml d'hexamethyldisilazane et 0,1 ml de triméthylchlorosilane. Après 15 mn environ, on injecte directement 0,1 à 0,2  $\mu$ l du surnageant dans le chromatographe.

## 2.2.2. Analyse des acides organiques aliphatiques

Les acides organiques sont séparés sur colonne de Polypropylène glycol adipate (Réoplex 400) sous forme d'esters méthyliques en programmation de température (Harmon et coll., 1969; Morard et coll., 1971; Ewis et col., 1975). Récemment, une nouvelle phase stationnaire (Silar 10 C), de meilleure tenue à haute température que Réoplex 400, a été utilisée avec succès dans l'analyse des acides organiques non volatils (Bide, 1975).

La fraction contenant les acides organiques est évaporée à sec sous vide à 40 °C, en plaçant environ 5 g de soude en pastilles dans le ballon de réception pour piéger l'acide formique.

Deux méthodes de méthylation ont été utilisées avec un égal succès :

a. Le résidu sec est repris par 3 fois 0,5 ml de méthanol anhydre que l'on transfère dans un flacon à réaction comme décrit précédemment. On ajoute 0,1 ml d'HCl concentré et on laisse reposer pendant quatre heures dans une étuve à 60 °C. On ajoute ensuite 2 ml d'eau distillée puis 1 ml de chloroforme. On agite vigoureusement pendant deux minutes. La phase supérieure aqueuse est éliminée et la phase inférieure, chloroformique, est séchée par addition de quelques milligrammes de sulfate de sodium anhydre. La solution chloroformique peut-être injectée directement dans le chromatographe, où être amenée presque à sec, puis reprise par de l'éther.

b. Le résidu sec est repris par 3 fois 0,5 ml d'une solution de BF<sub>3</sub> à 14 % dans le méthanol. Le tube fermé est ensuite plongé dans l'eau bouillante pendant

deux à trois minutes, puis refroidi immédiatement dans un bain de glace. L'extraction se fait comme précédemment.

### 2.2.3. Analyse des acides aminés

L'analyse chromatographique en phase gazeuse des acides aminés sous forme d'esters *n*-butyl-trifluoroacétiques a été mise au point à partir de travaux tels que ceux de Gehrke et coll. (1971). La séparation se fait sur colonne en verre Pyrex contenant du silicone OV 17, en programmation de température.

La fraction contenant les acides aminés est évaporée sous vide à 45 °C jusqu'à dessiccation totale; le résidu est repris par 4 fois 0,5 ml de méthanol anhydre chauffé à 60 °C environ, puis transféré dans de petites fioles à réaction. On fait passer un courant d'HCl gazeux anhydre dans la solution à 25 °C pendant 30 mn, puis on évapore sous vide à 40 °C. On reprend par 4 fois 0,5 ml de *n*-butanol anhydre à 100 °C et on fait passer le courant gazeux d'HCl anhydre pendant 2 h 30 à 100 °C. On évapore sous vide à 40 °C puis on reprend le résidu par 3 fois 0,5 ml d'anhydride trifluoroacétique.

Après deux heures environ la réaction est totale et l'on peut injecter directement 1 à 3 µl de la solution dans le chromatographe.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les chromatogrammes représentés ont été obtenus à partir de solutions nutritives dans lesquelles des

plants de riz âgés de 20 jours se sont développés pendant 15 jours. Les résultats quantitatifs correspondant à la moyenne de 4 plantes sont rapportés au tableau II.

### 1. SUCRES

On constate la présence de quelques oses. Le glucose est en quantité relativement importante. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Mac Rae et coll. (1967).

La présence fréquente des deux isomères  $\alpha$  et  $\beta$  est due aux conditions mêmes de préparation des dérivés et ne traduit pas la réalité. Il convient donc d'additionner la surface des deux pics pour obtenir une valeur quantitative de chaque sucre. Ce calcul est réalisé par référence aux valeurs trouvées sur le chromatogramme étalon.

### 2. ACIDES ORGANIQUES

Ils sont peu abondants et représentés par les acides succinique, aconitique, et citrique, mais la méthode utilisée ici, qui fait intervenir une évaporation sous vide en milieu acide, ne permet pas de détecter les acides organiques volatils qui peuvent exister en quantité relativement importante dans les exsudats du riz (Rivière, 1960). Ces derniers pourraient être détectés très facilement sous forme libre en extrait éthéré sur une colonne DEGS + PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub>.

Le chromatogramme d'étalonnage représenté fig. 3 a été obtenu à partir d'une solution étalon d'acides

TABLEAU II  
EXSUDATION RACINAIRE DE PLANTS DE RIZ AGES DE 20 JOURS,  
MESUREE APRES 15 JOURS DE CROISSANCE DANS UN MILIEU DE CULTURE HYDROPONIQUE

Sucres (mg/plante)	Ac. organiques (mg/plante)	Ac. aminés (mg/plante)
Arabinose = 0,008	Oxalique = 0,057	Ala + Ile = 0,100
Ribose = 0,015	Succinique = 0,009	Ser = 0,048
Xylose = 0,008	Aconitique = 0,009	Gly = 0,010
Mannose + Fructose = 0,008	Citrique = 0,040	Val = 0,007
Galactose = 0,016		Thr + leu = 0,290
Glucose = 1,80		Hypro = 0,030
		Met = 0,037
		Phe = 0,074
		Tyr = 0,200
		Lys = 0,037
		Arg = 0,080
		Try = Traces
Total $\approx$ 1,9	$\approx$ 0,1	$\approx$ 0,9

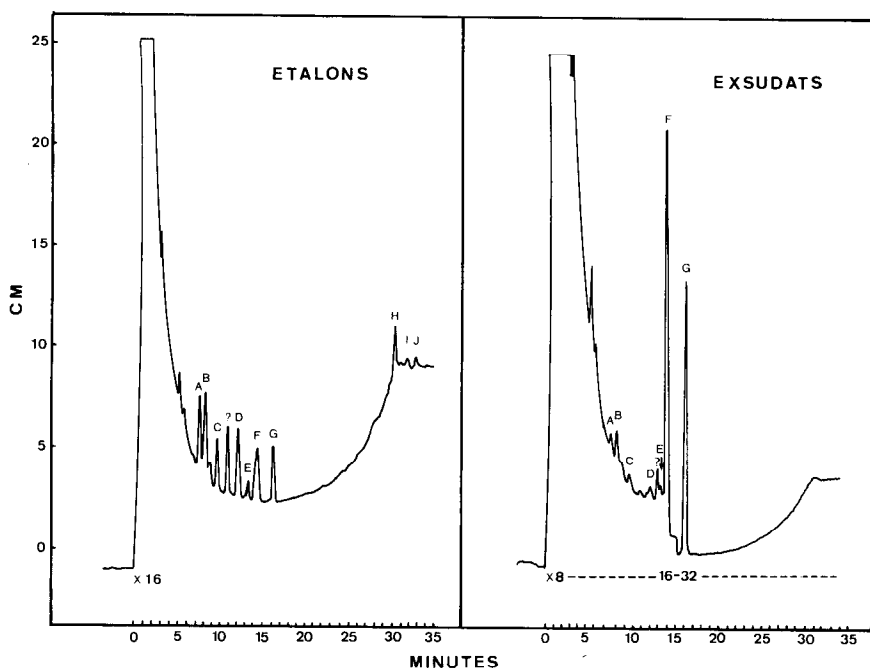


Fig. 2. — Séparation des sucres sous forme de dérivés triméthylsilylés. Injection 1  $\mu$ l de solution, soit 0,1  $\mu$ g de chaque sucre pour les étalons. Colonne acier inox de 200 cm  $\times$  0,3 cm, remplie de SE 52 à 4% sur chromosorb W.DMCS 80/100 mesh. Conditions : Température initiale = 140 °C. Vitesse de programmation 4°/mn. Température finale : 260 °C. Injecteur 200 °C. Détecteur 280 °C. Débits : azote 30 ml/mn; hydrogène : 25 ml/mn. B : Ribose. C : Xylose. D : Mannose + Fructose. E : Galactose. F :  $\alpha$  glucose. G :  $\beta$  glucose. H : Lactose + saccharose. I :  $\alpha$  Maltose. J :  $\beta$  Maltose.

organiques traitée de manière identique à la solution d'exsudats. Il faut noter que certains acides tels que l'oxalo-acétique, le gluconique et le tartique ne peuvent pas être détectés par cette méthode, si bien que leur présence n'est pas exclue dans les exsudats du riz.

### 3. ACIDES AMINÉS

Les conditions adoptées ici pour l'analyse des acides aminés permettent la mise en évidence de 18 acides aminés, mais seulement 12 d'entre eux peuvent faire

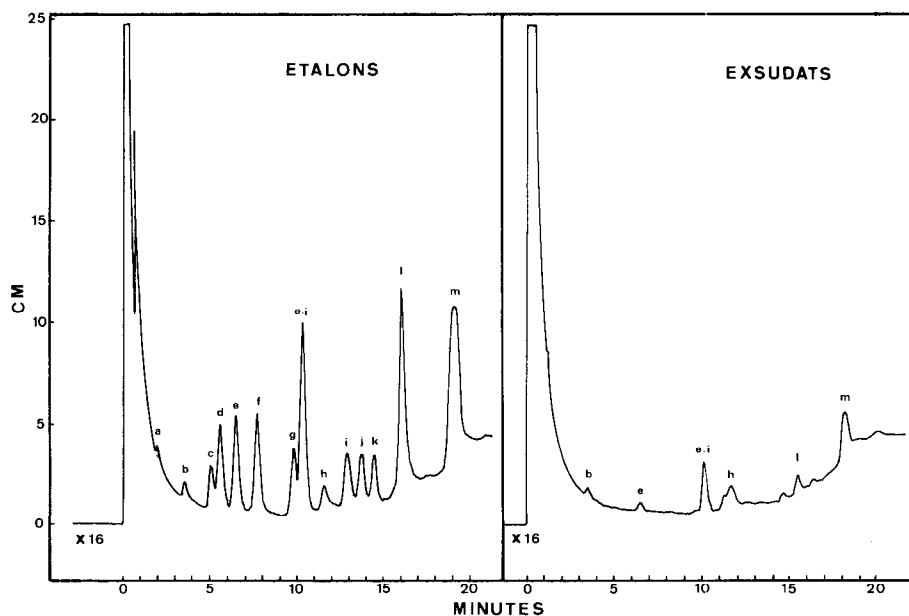


Fig. 3. — Séparation des acides organiques sous forme d'esters méthyliques. Injection 2  $\mu$ l de solution, soit 0,2  $\mu$ g de chaque acide pour les étalons. Colonne acier inox de 60 cm  $\times$  0,3 cm remplie de Reoplex 400 (Polypropylène Glycol Adipate) à 10% sur chromosorb W 60/80 mesh.

Conditions : Température initiale 50 °C. Vitesse de programmation 6°/mn. Température finale 150 °C. Injecteur 150 °C. Détecteur 170 °C. Débits : azote 30 ml/mn; hydrogène 25 ml/mn; air 300 ml/mn. a : Lactate. b : Oxalate. c : Malonate. d : Fumarate. e : Succinate. f : Maléate. g : indéterminé. h : indéterminé. i : Malate. j : glutarate. k :  $\alpha$  céto glutarate. l : Aconite. m : Citrate. Etalon interne : Adipate.

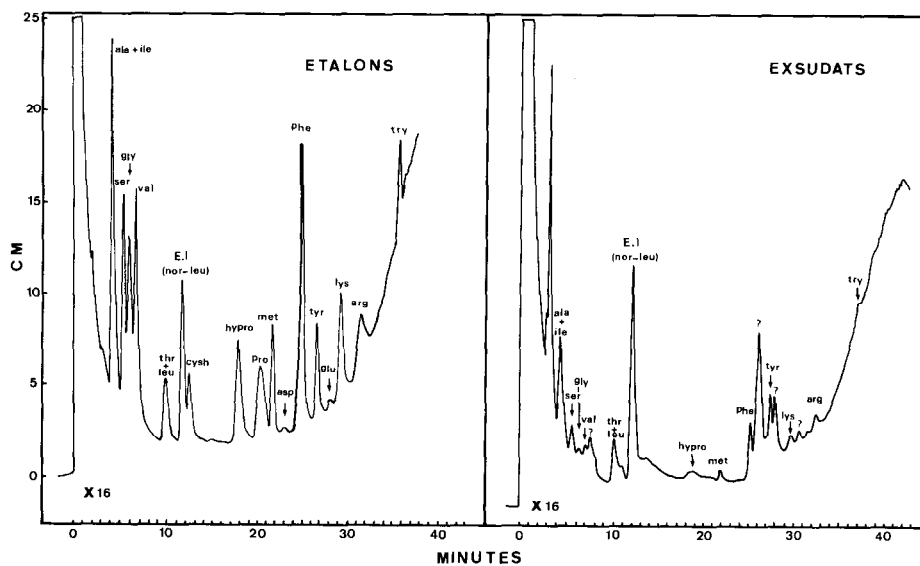


Fig. 4. — Séparation des acides aminés sous forme d'esters N-Butyltrifluoroacétiques. Injection de 3  $\mu$ l de solution soit 1,2  $\mu$ g de chaque acide pour les étalons. Colonne en verre Pyrex de 366 cm  $\times$  2 mm intérieur, remplie de silicone OV-17 à 3% sur chromosorb G.H.P. 100/120 mesh. Conditions : Température initiale 125 °C, isotherme pendant 8 minutes puis programmation à 4°/mn jusqu'à 260 °C. Injecteur 250 °C ; Détecteur 280 °C. Débits : azote 34 ml/mn ; hydrogène 25 ml/mn ; air 300 ml/mn. Etalon interne : Nor-Leucine.

l'objet d'une détermination quantitative. En effet, l'Alanine et l'Isoleucine ne sont pas séparés ainsi que la Thréonine et la Leucine. De plus, l'acylation de l'Arginine et du Tryptophane est aléatoire. L'Histidine et la Cystine peuvent être séparés sur cette colonne mais leur détermination quantitative nécessite l'emploi d'un appareil à double colonne utilisé en programmation différentielle afin de stabiliser la ligne de base.

Le chromatogramme étalon a été obtenu par le traitement d'une solution connue d'acides aminés, dans des conditions identiques à celles subies par la solution d'exsudats.

Dans les exsudats analysés, nous avons mis en évidence une dizaine d'acides aminés, ce qui confirme les résultats obtenus sur le riz par Mac Rae et coll. (1967).

## CONCLUSION

La méthode décrite permet l'analyse des principaux sucres, acides aminés et acides organiques contenus dans les exsudats racinaires d'une plante cultivée en milieu minéral axénique.

Les quantités détectables varient entre  $10^{-5}$  et  $10^{-9}$  grammes par échantillon, suivant la nature du produit.

La sensibilité de la méthode pourrait permettre de suivre des variations de concentration d'exsudats à intervalles très rapprochés et d'étudier de façon précise la physiologie de l'exsudation racinaire.

Manuscrit reçu au Service des Publications le 11 mai 1977

## BIBLIOGRAPHIE

- AYERS (W.A.) and THORNTON (R.H.), 1968. — Exudation of aminoacids by intact and damaged roots of Wheat and Peas. *Plant and Soil*, 28, n° 2 : 193-207.
- BARBER (D.A.), 1967. — The effect of Micro-organisms on the absorption of Inorganic Nutrients by intact plants. I: Apparatus and culture technique. *J. of Exp. Bot*, 18, n° 54 : 163-169.
- BEND (R.), GIRARD (T.H.) et BALDO (S.), 1964. — Dispositif stérile pour cultures hydroponiques et études de rhizosphère. *Biologie du Sol*, 2 : 35-37.
- BIDE (R.W.), 1975. — Gas chromatography of Krebs Cycle and Related acids on Silar 10C-Clin. *Biochem*, 8 : 148-150.
- BOULTER (D.), JÉRÉMY (J.J.) and WILDING (M.), 1966. — Amino acids liberated into the culture medium by pea seedlings roots. *Plant and Soil*, 24, n° 1 : 121-127.
- BUSCH (H.), HURLBERT (R.B.) and VANPOTTER (R.), 1952. — Anion exchange chromatography of acids of the citric acid cycle. *J. Biol. Chem*, 196, p. 717.
- CLAYTON (M.F.) and LAMBERTON (J.A.), 1964. — A study of Root exudates by the Fog-Box Technique. *Aust. J. Biol. Sci.*, 17 : 855-866.
- GEHRKE (C.W.), KUO (K.) and ZUMWALT (R.W.), 1971. — The complete gas liquid chromatographic separation of the twenty protein amino acids. *J. Chromatogr*, 57 : 209-217.
- GEHRKE (C.W.) and STALLING (L.D.), 1967. — Quantitative analysis of the twenty natural protein amino

- acids by gas liquid chromatography. *Separation Science*, 2 (1) : 101-138.
- HAHN (N. J.), 1967. — A stérile culture chamber for plants, *Can. J. Bot.*, 45 : 283-286.
- HARMON (M. A.) and DOELLE (H. W.), 1969. — Gas chromatographic separation and determination of microquantities of the esters of the tricarboxylic acid cycle acids and related compounds. *J. Chromatogr.*, 42, n° 2 : 157-169.
- IVARSON (K. C.) and SOWDEN (F. J.), 1969. — Free amino acid composition of the Plant Root Environment under field conditions. *Can. J. Soil. Sci.*, 49 : 121-127.
- KARIM (A.) and SHAHJAHAN ALI (M. D.), 1969. — A study on cation-anion relationships in the nutrition of rice plants. *Sci. Researches*, 6, n° 4 : 203-213.
- KOVACS (Jr.), 1971. — Identification of Aliphatic and Aromatic acids in root and seed exudates of Peas, Cotton and Barley. *Plant and Soil*, 34 : 441-451.
- LEWIS (A. I.) and MILLER (J. D. A.), 1975. — Ketoacid metabolism in *Desulfovibrio*. *J. Gen. Microbio.*, 90 : 286-292.
- MAC DOUGALL (B. M.), 1970. — Movement of <sup>14</sup>C pytosynthate into the roots of Wheat seedlings and exudation of <sup>14</sup>C from intact roots. *New Phytol.*, 69 : 37-46.
- MAC-RAE (I. C.) and TERESITA CASTRO (F.), 1967. — Root exudates of the rice plant in relation to akagare, a physiological disorder of rice. *Plant and Soil*, 26, n° 2 : 317-323.
- MACURA (J.), 1966. — Interactions nutritionnelles plantes-bactéries et bases expérimentales de la bactérisation des graines. Rapport général. *Ann. Inst. Past.*, 111 : 9-38.
- MACURA (J.), 1971. — Some biological and ecological aspects of the rhizosphere effect. *Folia Microbio*, 16 : 328-336.
- MILLER (R. H.) and SCHMIDT (E. L.), 1965. — A technique for maintaining a sterile soil plant root environment, and its application to the study of amino acids in the rhizosphere. *Soil Science*, 100, n° 4 : 267-273.
- MORARD (P.) and BOURRIER (E.), 1971. — Dosage de quelques acides organiques végétaux par chromatographie en phase gazeuse. *Chim-Anal*, 53, n° 5 : 315-322.
- OKUDA (A.) and TAKAHASHI (E.), 1965. — The role of silicon; in I.R.R.I. *The Mineral Nutrition of the rice plant*. Proc. Symp. I.R.R.I., feb. 1964; The Johns Hopkins Press, Baltimore : 123-146.
- RICHTER (M.), WILMS (W.) and SHEFFER (F.), 1968. — Determination of root exudates in a sterile continuous Flow Culture. I: The Culture Method. II: Short term and Long term Variations of exudation intensity. *Plant. Physiol.*, 43 : 1741-1754.
- RIVIÈRE (J.), 1960. — Etude de la rhizosphère du Blé. *Ann. Agron.*, 11, n° 4 : 397-440.
- ROVIRA (A. D.), 1959. — Root excretions in relation to the rhizosphere effect. IV: Influence of plant species, Age of plant, Light, Temperature and calcium nutrition on exudation. *Plant and Soil*, 11, n° 1 : 53-64.
- SADHU (M. K.) and DAS (T. M.), 1971. — Studies on root exudates of rice seedlings. Factors influencing the liberation of growth inhibiting substances. *Indian. Agric.*, 15, n° 1 et 2 : 87-94.
- SADHU (M. K.) and DAS (T. M.), 1971. — Root exudates of rise seedlings. The influence of one variety on another. *Plant and Soil*, 34 : 541-546.
- SHAY (J.), 1970. — These. The effect of low levels of calcium on exudation of sugars from peanut roots under gnotobiotic conditions. Virginia Polytech. Inst. and State Univ. Ph. D. Blacksburg, Virginia 24061.
- SINGH (J. N.) and SINGH (T. N.), 1967. — Growth and Nitrogen uptake by rice plants in relation to nitrogen supply in culture medium, *The J. Sci. Resear.*, 17, (1) : 53-63.
- STOTZKY (G.), CULBRETH (W.) and MISH (L. B.), 1962. — Apparatus for growing plants with aseptic roots for collection of roots exudates and CO<sub>2</sub>. *Plant physiol.*, 37 : 332-341.
- SWEELEY (C. C.), BENTLEY (R.), MAKITA (M.) and WELLS (W. W.), 1963. — The trimethylsilylation of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, n° 16 : 2497-2507.
- TAKAHASHI (E.), 1968. — Silica as a Nutrient to the Rice Plant. *Japan. Agric. Resear. quart.*, 3, n° 3 : 1-4.
- VANCURA (V.), 1964. — Root exudates of plants, I: Analysis of root exudates of Barley and Wheat in their initial phases of growth. *Plant and Soil*, 21, n° 2 : 231-248.
- VANCURA (V.) and HOVADIK (A.), 1965. — Root exudates of plants. II: Composition of root exudates of some vegetables. *Plant and Soil*, 22, n° 1 : 21-32.
- VANCURA (V.), 1967. — Root exudates of plants. III: Effect of temperature and "Cold Shock" on the exudation of various compounds from seeds and seedlings of maize and cucumber. *Plant and Soil*, 27, n° 3 : 319-328.
- ZUMWALT (R. W.), ROACH (D.) and GEHRKE (C. W.), 1970. — Gas liquid chromatography of amino acids in biological substances. *J. chromatogr.*, 53 : 171-193.