

Étude quantitative du carbone libéré par les racines de maïs cultivé en conditions contrôlées sous $^{14}\text{CO}_2$

PAUL-ANTOINE LESPINAT *, MARCEL ANDRÉ * et MARC BOUREAU **

* Service de Radio-agronomie, C. E. N. Cadarache, B. P. n° 1
13115 Saint-Paul-lez-Durance

** Laboratoire de Microbiologie des Sols, O. R. S. T. O. M., B. P. n° 1386, Dakar

(Manuscrit reçu le 11 décembre 1974)

RÉSUMÉ

On a mis au point une technique pour la culture aseptique de plantes entières dans des conditions très contrôlées sous $^{14}\text{CO}_2$ durant de longues périodes. Avec cette technique, il est possible d'étudier le rejet de composés marqués au ^{14}C par les racines de maïs en liaison avec l'assimilation photosynthétique du $^{14}\text{CO}_2$.

Durant des expériences de courte durée (1 jour), on a montré que le rejet horaire de carbone par les racines ne suivait pas l'assimilation du carbone par les feuilles.

Durant des expériences de longue durée (jusqu'à 2 mois), il y avait une étroite relation entre les quantités de ^{14}C assimilées par les feuilles et rejetées par les racines chaque jour. Les plantes âgées rejetaient plus de carbone dans le milieu que les plantes jeunes.

SUMMARY

A technique has been devised for aseptic cultivation of higher plants in environmental controlled conditions under $^{14}\text{CO}_2$. This proved suitable, even over long period, for studying maize root excretion of ^{14}C -labelled compounds in relation to photosynthetic assimilation of $^{14}\text{CO}_2$.

During short-term experiments (1 day) root excretion per hour does not follow assimilation of $^{14}\text{CO}_2$.

During long-term experiments (up to 2 months), a close relation is found between the quantity of ^{14}C daily assimilated by leaves and that excreted by roots. Old plants were observed to excreted much more carbon than young ones.

Les racines des plantes libèrent autour d'elles et particulièrement dans leur voisinage immédiat — la rhizosphère — des composés de type très divers qui ont une grande influence sur la matière organique des sols (SAMSEVITCH, 1971), les autres plantes (TUKEY, 1969), et bien entendu la microflore et la microfaune (BOWEN et ROVIRA, 1973).

Sur le plan qualitatif, de nombreuses études ont été menées qui ont abouti à identifier un grand nombre de substances (acides aminés et organiques, sucres, vitamines, pigments, ...). Sur le plan quantitatif, eu égard aux faibles quantités en cause et à la nécessité d'opérer dans des conditions très contrôlées, il y a peu de données précises. En particulier pour le carbone qui représente cependant le meilleur « indicateur » de l'ensemble des composés libérés par les racines.

Les résultats portent uniquement sur des bilans effectués dans des conditions spéciales. Par exemple MESKHOV (1961), a récupéré après culture de Pois et de Maïs durant 87 jours dans des solutions nutritives stériles permanentes ou renouvelées, respectivement 2,75 à 10 % et 0,96 à 2,26 % du carbone total des végétaux. ROVIRA et MACDOUGALL (1965, 1967) ont eu recours à une technique de marquage sous forme d'une injection unique de $^{14}\text{CO}_2$ à des plantules de Blé (pulse-labelling), pour apprécier l'importance du phénomène de libération et déterminer les facteurs susceptibles de le faire varier. Ces auteurs ont trouvé des rapports C libéré par les racines/C assimilé compris entre 0,2 et 0,4 % par 24 heures. MARTIN (1971) a également employé la technique des marquages brefs par $^{14}\text{CO}_2$ mais à différentes étapes de la croissance d'une même plante, ce qui lui a permis de retrouver après 11 semaines de culture, dans des éluats de sols où s'étaient développés des Ray-Grass, Luzerne et Blé, respectivement 0,05, 0,14 et 0,25 % du ^{14}C appliqué en dix fois après la dixième semaine.

Si la connaissance de tels bilans est intéressante, il est néanmoins aussi important de suivre les variations des quantités de carbone exporté par les racines tout au long de la croissance des plantes, dans des temps, plus courts de l'ordre de la journée et même de l'heure; elles ont en effet des répercussions très directes sur la microflore rhizosphérique qui trouve à sa disposition des quantités de substrats nutritifs variables. Des processus associés se déroulant à ce niveau, tels que la fixation non symbiotique de l'azote, pourraient ainsi subir des changements très rapides dans de courts laps de temps (BALANDREAU *et al.*, 1971).

Il n'y a pas de résultats globaux concernant le carbone dans ce domaine; divers auteurs ont utilisé des dispositifs complexes pour mener des végétaux dans un environnement contrôlé, mais ils n'ont analysé que certains produits particuliers : sucres (SHAY et HALE, 1973, HAMLIN *et al.*, 1972, qui ont utilisé la technique très sophistiquée des « incubateurs »); acides aminés (RICHTER *et al.*, 1968) ou CO_2 (WARENBORG et PAUL, 1973). Seuls ces derniers auteurs ont fait appel au ^{14}C mais avec une technique particulière applicable surtout aux champs.

Afin d'avoir une idée plus précise des quantités de carbone libérées par les racines durant des temps courts et longs dans un milieu très contrôlé, une série d'expériences a été menée avec du Maïs (variété INRA F7 x F2) grâce à un dispositif original assurant des conditions connues tant au niveau des racines que des parties aériennes et un marquage continu par $^{14}\text{CO}_2$.

LA TECHNIQUE DE CULTURE DES PLANTES

Les plants de Maïs sont cultivés en aquiculture avec les racines maintenues stériles dans des pots individuels placés sous le plancher d'une cellule de culture spéciale entièrement close. Ces pots sont regroupés par 5 sur un bâti transportable avec tous leurs systèmes d'aération, d'alimentation en milieu nutritif et de prélèvement. Les cellules de type C2 3A (chambres de culture automatiques

en atmosphère artificielle) ont été décrites en détail par ailleurs (ANDRÉ et coll., 1974) aussi sera-t-il question ici plus particulièrement

- des composants du système de culture au niveau des racines;
- des méthodes utilisées pour obtenir et maintenir la stérilité;
- de la mise en place des expériences;
- des modes de fonctionnement du système de culture.

A. Composants du système de culture au niveau racinaire

● Les pots en verre dans lesquels sont maintenues les racines ont un volume total de 1 l et comportent trois tubulures à leur sommet et à leur base. Les tubulures basses sont munies de disques en verre fritté afin d'empêcher le passage du chevelu racinaire. Les deux tubulures latérales hautes sont décalées de 90°. La tubulure centrale de grand diamètre reçoit un « tube porte-plante » et comporte un pas de vis extérieur permettant la fixation étanche sous le plancher de la cellule C2 3A.

● Le tube porte-plante comporte à sa base un grillage à mailles de 2 mm en acier inox ou en nylon destiné à retenir la graine. Il est possible de doubler la longueur de ce tube par un tuyau en verre de même diamètre fixé à son sommet par du Scotch 33. Deux joints toriques assurent l'étanchéité entre le pot de culture et le tube porte-plante, permettant ébalement à ce dernier de coulisser sur quelques centimètres.

● La réserve de solution nutritive consiste en un ballon de 5 l avec un couvercle.

● Les flacons de prélèvement sont des récipients en verre de 1 l avec une tubulure basse et deux hautes.

● Deux pompes péristaltiques Desaga à six canaux assurent une circulation sans à coup du milieu nutritif.

● Les tuyaux de liaison entre les différents composants du système sont en « Rhodorsil » et résistent particulièrement bien à l'autoclavage et à la pression. Le diamètre le plus couramment employé est 2-5,5 mm (intérieur-extérieur).

● Les supports filtres sur les circuits de milieu nutritif sont des Twin 90 Millipore préstérilisés. Sur les circuits d'aération sont utilisés conjointement des tubes remplis de coton cardé des Swinnex 47 ou des Inline 47 Millipore.

B. Méthodes pour obtenir et maintenir des conditions axéniques

Tous les matériels sont stérilisés par passage à l'autoclavage durant 1 heure à la température de 121°C; une stérilisation supplémentaire de 20 minutes est nécessaire pour les membranes filtrantes de 0,22 μ mises en place après le premier autoclavage.

Toutes les manipulations s'effectuent dans le flux stérile d'une hotte à courant laminaire de grand modèle équipée d'un filtre de 0,2 μ .

Afin d'obtenir des plantules homogènes exemptes de contamination, les graines de Maïs sont agitées durant 35 minutes dans le filtrat d'une solution saturée d'hypochlorite de calcium puis repiquées sur un milieu gélosé complet semi-solide (Stotsky *et al.*, 1961).

Au début de leur croissance et après repiquage dans les pots de culture, les plantules se développent dans un environnement axénique à l'intérieur du tube porte-plante, prolongé et bouché par un tampon de coton cardé. Lorsque les feuilles atteignent ce bouchon le tube additionnel est enlevé et un joint de sable hydrofugé est mis en place au niveau du collet des plantes (TARDIEUX-ROCHE et TARDIEUX, 1970) et recouvert par un tampon de coton cardé ou un joint souple en élastomère RTV 502 Rhône-Poulenc.

C. Mise en place d'une expérience

Au quatrième ou cinquième jour après le semis sur gélose, cinq plantules saines et homogènes sont déposées sur la grille du tube porte-plantule, afin de stabiliser la plantule et d'empêcher le joint sable de couler dans le milieu, un peu de perlite est également ajoutée sur cette grille sans contact avec la solution nutritive.

Les pots sont ensuite remplis jusqu'à un niveau affleurant la graine de solution nutritive stérile Hoagland-Arnon n° 2 (HOAGLAND ET ARNON, 1950), diluée de moitié et amenée à pH 4 grâce à du H_2SO_4 et dans lequel le fer est apporté sous forme de $FeSO_4$, à raison de $2 \cdot 10^{-6}$, HAGEMAN *et al.* (1962), ont montré que les plantules de Maïs se développent particulièrement bien dans un milieu à ce pH et avec cette dose de fer. ROVIRA ET RIDGE (1973), ont d'autre part conclu que les composés organiques libérés par les racines ne sont pas modifiés par l'emploi dans le milieu, pour obtenir un pH fixe, de SO_4H_2 .

Les cinq pots sont ensuite regroupés sur le bâti transportable qui est mis en place sous la cellule C2 3A; on applique une surpression à tous les circuits afin de détecter des fuites éventuelles après quoi les régulations de température, humidité, la lumière et le dispositif d'analyse de l'atmosphère sont mis en route simultanément. La teneur de l'air en CO_2 est fixée à $330 \cdot 10^{-6}$ avec un marquage de $35 \mu Ci$ par gramme de carbone.

Un cycle jour-nuit de 14 heures-10 heures est adopté avec des températures de $25 \pm 0,5^\circ C$ et de $16 \pm 0,4^\circ C$ respectivement et des humidités voisines de $70 \pm 10\%$ la nuit et le jour.

- Au niveau des pots qui sont entourés de papier noir afin de supprimer toutes lumières vers les racines, une température de $20,5^\circ \pm 0,6^\circ C$ est maintenue.

- Au niveau des parties aériennes, l'intensité lumineuse avoisine 40 000 lux en haut de la cellule et 25 000 lux en bas, soit un flux énergétique total de 50 at $30 mW/cm^2$, grâce à deux lampes Osram HWLS de 1 000 W.

D. Modes de fonctionnement du système de culture

Dans une première série d'expériences, le système de culture n° 1 (voir fig. 1) fut utilisé; dans son principe, ce montage est analogue à celui de STOLSKY *et al.* (1961), TARDIEUX-ROCHE ET TARDIEUX (1970), PROMIN ET VORONKAVA (1973), c'est-à-dire que les apports et prélèvements de solution nutritive sont *discontinus* et se font par l'intermédiaire d'un circuit unique. Ce système donna de bons résultats sur le plan de la stérilité mais par contre il fut très difficile de maintenir un niveau constant de solution nutritive et la radioactivité émise par les racines fut fluctuante.

Un autre système fut donc mis au point basé sur le principe de la *circulation continue* de la solution nutritive; RICHTER *et al.* (1968) ont obtenu durant des expériences sur des temps longs de très bons résultats avec un montage de ce type.

Le dispositif adopté en définitive (voir fig. 2) se distingue par les points suivants :

- La graine et les racines sont séparés ce qui permet de recueillir uniquement les composés en provenance de ces dernières [VANCURA ET HANZLIKOVA (1972) ont démontré que dans certains cas, ces produits sont différents de ceux émis par la graine].

- L'aération du milieu nutritif est rigoureusement contrôlée au moyen de microvannes à pointeaux.

- Les pompes péristaltiques sont réglées de façon particulière : le débit de la pompe II (= pompe de prélèvement) est fixé une fois pour toutes en début d'expérience à une valeur précise et connue, cependant que le débit de la pompe I (= pompe d'alimentation) est ajustée au fur et à mesure du développement des plantes afin de compenser les pertes par transpiration et de maintenir

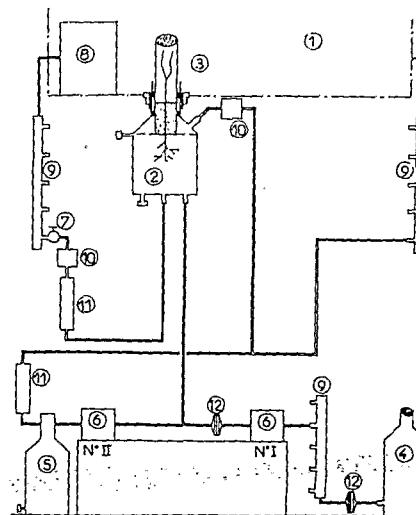
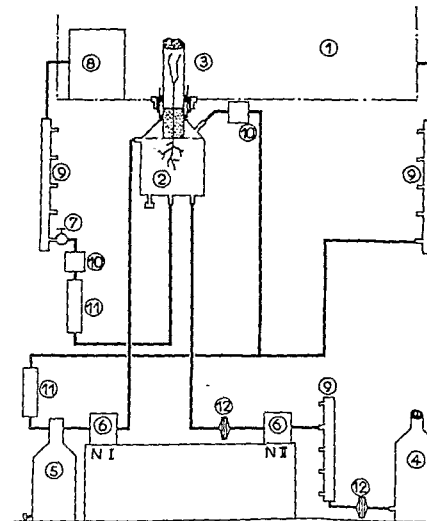


FIG. 1 et 2. — Systèmes de culture avec renouvellement discontinu (fig. 1) et continu (fig. 2) de la solution nutritive.

- (1) Cellule C2 3A;
- (2) Pot de culture;
- (3) Tube porte-plantule;
- (4) Réserve de milieu nutritif;
- (5) Flacon de prélèvement;
- (6) Pompe péristaltique;
- (7) Vanne à débit réglable;
- (8) Pompe d'aquarium;
- (9) Rampe de distribution;
- (10) Support filtre Swinnex 47 ou Inline;
- (11) Tube rempli de coton cardé;
- (12) Filtre Twin 90.

dans le pot de culture un niveau constant de solution. Cet ajustement est facilité par le fait que l'on recueille régulièrement l'eau condensée dans la cellule de qui donne une bonne approximation de la transpiration totale des jours précédents.

Les prélèvements de solution nutritive s'effectuent chaque matin avant le début de la période lumineuse. Ces prélèvements sont immédiatement traités de la façon suivante :

— Incubation sur milieu gélosé complet de quelques gouttes afin de détecter toute contamination (en début, milieu et fin d'expérience); le milieu gélosé comprend de la peptone, du glucose, de l'extrait de levure et du KH_2PO_4 en sus de l'agar.

— Mesure du volume recueilli et de son pH.

— Filtration sur préfiltre et membrane filtrante à pores de $0,22 \mu$ (ce qui permet de séparer une « fraction soluble » avec des composés simples et une « fraction insoluble » avec surtout des débris cellulaires résultat du phénomène de desquamation).

— Concentration sous vide (éventuellement).

— Comptages des préfiltres et membranes filtrantes puis du filtrat dans un mélange scintillant toluène/triton X-100 2/1 (MURRAY, 1971), avec un compteur à scintillation liquide de type SL30 Intertechnique, comportant un dispositif automatique pour l'étalonnage externe.

RÉSULTATS

Dans toutes les expériences, le ^{14}C libéré dans les prélèvements se rapporte au bilan net de la radio-activité en solution c'est-à-dire à la différence entre le ^{14}C libéré et le ^{14}C réabsorbé; on sait que si cette réabsorption est possible, elle n'intéresse normalement qu'une très faible partie des composés organiques présents dans le milieu (SAUERBECK et FUHR, 1966 a). De même le ^{14}C assimilé fait essentiellement référence au ^{14}C photosynthétisé; en effet la fixation du CO_2 directement par les racines de Maïs paraît être un phénomène très limité (NECHIPORENKO et IVANOV, 1973) et le pH particulièrement bas de la solution nutritive employée n'a d'autre part facilité cette fixation (un pot témoin sans plante et aéré de la même façon que les pots avec plante n'a retenu aucune radioactivité mesurable).

1° Évolution de la libération du ^{14}C dans des temps courts :

Sur des plants de Maïs (variété INRA F7×F2) cultivés avec le système de culture n° 1, deux expériences particulières de courte durée furent menées à 55 et 62 jours après le semis. Dans ce cas précis la solution nutritive fut changée 1 jour avant le début des expériences puis à partir du temps 0 des prélèvements de 5 ml furent effectués toutes les heures avec des seringues stériles à travers des bouchons en caoutchouc disposés sur le côté des pots. Des injections concomitantes de solution et d'eau stériles furent faites afin de compenser les pertes et de maintenir un milieu constant durant la durée de l'expérience.

Sur la figure 3 sont donnés les résultats en terme de bilan cumulé des expériences à 55 et 62 jours pour la fraction soluble, c'est-à-dire la fraction passée à travers les membranes de $0,22 \mu$. Certains détails différaient d'une expérience à l'autre :

Les racines des végétaux de 55 jours baignaient dans 850 ml de milieu et l'aération de ce milieu était assurée par de l'air marqué de la cellule, alors que les plants

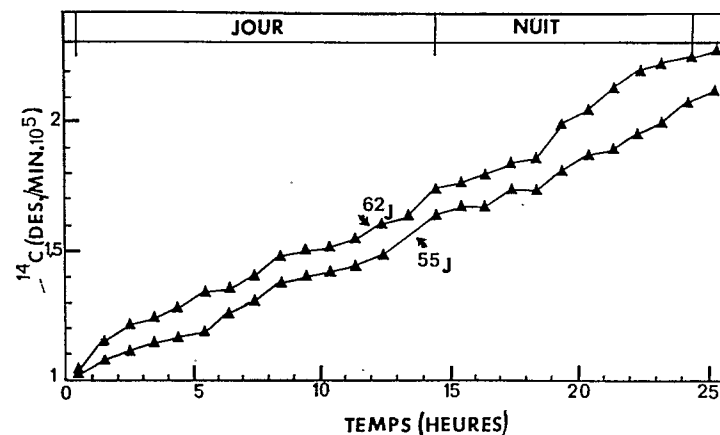


Fig. 3. — Évolution durant une journée (14 heures de jour-10 heures de nuit), dans un milieu maintenu constant, du ^{14}C total originaire de racines de Maïs marqué *via* $^{14}\text{CO}_2$ (fraction soluble). Bilan cumulé par plante (moyenne de quatre pots).

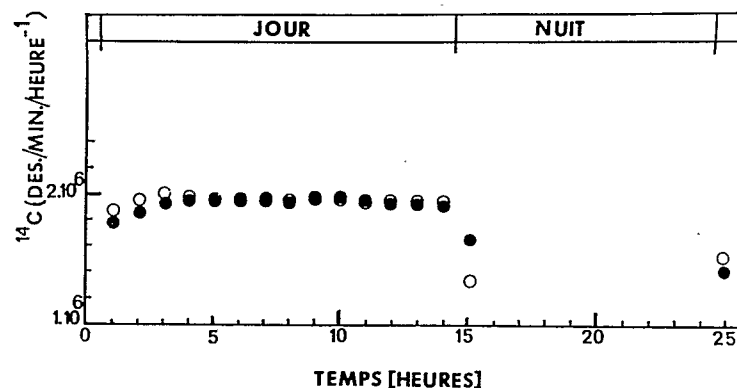


Fig. 4. — Assimilation du $^{14}\text{CO}_2$ durant l'expérience de la figure 3. Bilan horaire par plante (moyenne de quatre pots).

de 62 jours étaient maintenus dans 920 ml de milieu et qu'un joint en élastomère RTV 502 isolait complètement parties aériennes et racines; ces dernières étaient aérées par un mélange $\text{N}_2 + \text{O}_2$ (80/20).

La pose de ce joint et l'aération par un air sans CO_2 n'ont pas changé l'allure des courbes de libération comme on peut le constater sur la figure 3.

On a reporté sur la figure 4 les quantités de $^{14}\text{CO}_2$ assimilées par heure au cours des deux expériences ce qui permet de constater que la photosynthèse fut normale dans les deux cas.

Il n'est pas possible de relier au niveau des bilans horaires le carbone rejeté par les racines et le carbone photosynthétisé, puisqu'il y a un certain décalage entre les deux phénomènes, comme montré par ROVIRA et MACDOUGALL (1967). Cependant au niveau de la journée il est intéressant d'établir une telle comparaison qui s'insère dans le cadre plus général de l'étude de la répartition du carbone assimilé par les feuilles. Dans les deux expériences, à 55 et 62 jours, ce rapport est voisin de 0,7%.

2° Évolution du carbone libéré durant des temps longs

Avec le système de culture n° 2, on a mené une expérimentation de longue durée qui a permis de mesurer le ^{14}C originaire des racines pendant 20 jours sur des plantules âgées au départ de 11 jours.

Dans ce cas, les comptages sur des prélèvements permettent de calculer les bilans journaliers du ^{14}C dans chaque pot, c'est-à-dire la radioactivité originaire des racines dans l'intervalle de temps entre deux prélèvements successifs (24 heures).

Au jour t ce bilan journalier est égal à la quantité totale de ^{14}C dans le prélèvement de ce jour plus ou moins la variation de ^{14}C dans le pot de culture, ce qui peut s'exprimer par l'équation

$$E_t = V' \times C'_t + V \times (C_t - C_{t-1}),$$

avec E_t = Bilan du ^{14}C entre le jour $t-1$ et le jour t (en dés. $\text{min}^{-1}/\text{pot}$);
 V' = Volume prélevé entre $t-1$ et t (en ml);
 C'_t = ^{14}C dans le prélèvement au temps t (en dés. $\text{min}^{-1}/\text{ml}$);
 V = Volume de solution nutritive dans le pot de culture (en ml);
 C_t = ^{14}C dans le pot de culture au temps t (en dés. $\text{min}^{-1}/\text{ml}$).

Dans cette expérience, V est fixé à 860 ml et maintenu constant comme indiqué par variation du débit de la pompe I d'alimentation. Il se trouve que V' est égal à 860 ml environ, le débit de la pompe II de prélèvement étant de 36 ml par heure; ce rythme a été adopté car il correspond à une alimentation correcte en milieu nutritif sans perturbation importante du système racinaire. C'_t est mesuré directement chaque jour à partir des prélèvements effectués avant mise sous lumière des végétaux, C_t n'est pas mesuré. En effet, eu égard aux risques de contamination, il n'est pas possible d'effectuer des prélèvements directs dans le pot de culture ou sur le circuit de sortie durant toute la durée de l'expérience. On estime donc C_t à partir des mesures de C'_t . Etant donné le rythme des prélèvements et l'évolution rapide de la radioactivité originaire des racines, on prend

$$C_t = (C'_{t+1} + C'_t)/2.$$

Des essais ont montré que cette approximation ne faussait en rien le calcul des bilans journaliers qui sont donc finalement donnés par l'équation (1)

$$\begin{aligned} E_t &= V' \times C'_t + V \times [(C'_{t+1} + C'_t)/2 - (C'_t + C'_{t-1})/2] \\ &= V' \times C'_t + V \times (C'_{t+1} - C'_{t-1})/2. \end{aligned} \quad (1)$$

Le bilan cumulé de la radio-activité totale entre le jour 0 et le jour t est donné par l'équation (2) :

$$E_{(0,t)} = \left(V' \times \sum_0^t C'_t \right) + V \times (C'_{t+1} - C'_0)/2. \quad (2)$$

Les résultats en terme de bilans journaliers d'une expérience de 20 jours sont donnés sur la figure 5. Le jour 0 correspond au onzième jour après le semis des graines sur gélose et au cinquième jour après le début du marquage via $^{14}\text{CO}_2$.

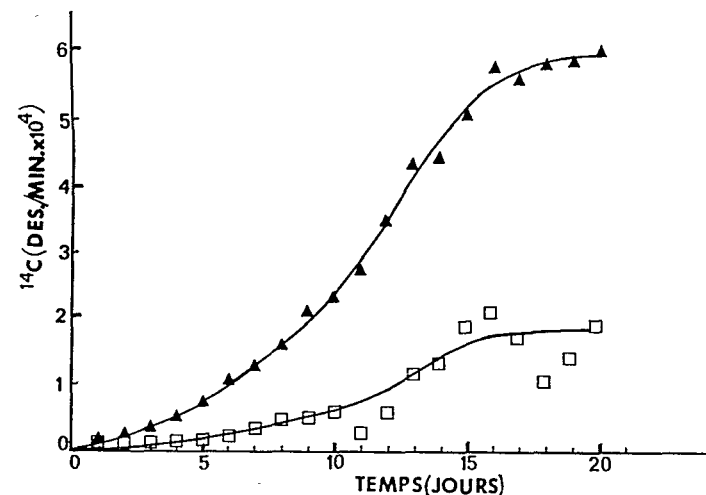


Fig. 5. — Évolution durant 20 jours (onzième au trente et unième jour après le semis) du ^{14}C total originaire de racines de Maïs marqués via $^{14}\text{CO}_2$. Bilan journalier par plante (moyenne de quatre pots).

▲ Fraction soluble;
 □ Fraction insoluble.

Une solution nutritive neuve fut apportée 1 jour avant le début des prélèvements. On a reporté les bilans journaliers pour les fractions solubles et insolubles de quatre plantes, un pot ayant été accidentellement contaminé dans la période entre le début du marquage et le départ de l'expérience proprement dite. L'homogénéité des résultats a été testée par une analyse de variance (test de BARTLETT avec des χ^2 respectifs de 1,92 et de 4,21 pour les fractions soluble et insoluble).

On remarque particulièrement l'évolution parallèle des deux fractions qui après avoir augmenté de façon très forte, restent relativement stables après le quinzième jour (ce fait est à mettre en relation soit avec une nutrition moins bonne à partir de cette date soit avec des perturbations de la photosynthèse qui eurent lieu à partir du quatorzième jour).

La mesure de la fraction insoluble pendant une aussi longue période a été rendue possible par le système de culture doux, non traumatisant. Rappelons que par

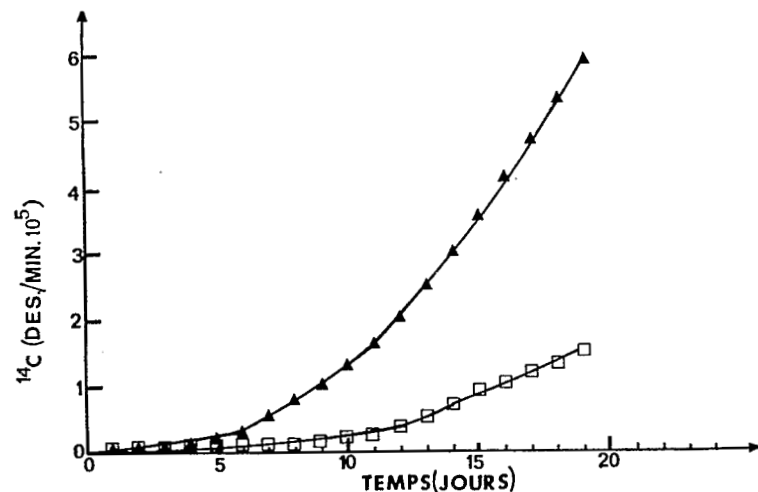


FIG. 6. — Évolution durant 20 jours (onzième au trente et unième jour après le semis), du ^{14}C total originare des racines de Maïs marqués *via* $^{14}\text{CO}_2$. Bilan cumulé par plante (moyenne, de quatre pots).

▲ Fraction soluble;
□ Fraction insoluble.

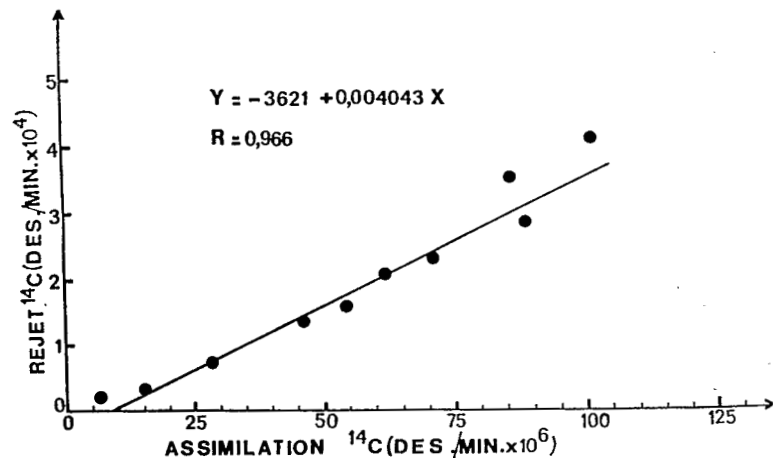


FIG. 7. — Relations entre le ^{14}C assimilé (en abscisse) et le ^{14}C libéré par les racines (en ordonnée) durant 24 heures dans une expérience de longue durée (20 jours). (Par suite de difficultés matérielles, les mesures de l'assimilation du $^{14}\text{CO}_2$ n'ont pu être effectuées avec une précision suffisante au-delà du quatorzième jour de cette expérience.)

exemple MACDOUGALL (1970) n'avait pu obtenir de résultats reproductibles pour cette fraction avec des plantules de Blé transportées dans de l'eau pure après marquages (après filtration dans des conditions assez semblables, de 2,7 à 32 % de la radioactivité était restée sur la membrane filtrante dans l'expérience de cet auteur).

Le bilan cumulé pour les deux fractions est reporté sur la figure 6; on voit que l'apport de carbone au milieu par les racines reste important chez le Maïs aux premiers stades de développement.

Sur la figure 7, on a mis en rapport le ^{14}C libéré et le ^{14}C assimilé durant les treize premiers jours de l'expérience (à partir du quatorzième jour, des difficultés de mesure du carbone assimilé se présentèrent, bien que le taux de CO_2 fut maintenu à un niveau relativement constant dans la cellule C23A). Comme indiqué plus haut il y a un léger décalage entre l'assimilation du carbone et son rejet subséquent par le système racinaire mais en terme de bilans journaliers durant une longue période, on peut mettre en rapport les deux phénomènes. Le tableau I complète l'information sur ce point en donnant les pourcentages ^{14}C rejeté par les racines/ ^{14}C assimilé; on constate que ces pourcentages ont tendance à augmenter avec le temps, mais de façon très légère.

TABLEAU I

Rapports journaliers entre les quantités totales de ^{14}C libéré par les racines et de $^{14}\text{CO}_2$ assimilé par les végétaux

Jour	2	3	5	7	8	9	10	11	12	13
^{14}C assimilé par jour (Dés. Min./Plante $\times 10^3$)	611	1428	2828	4669	5426	6202	7147	8891	8531	10112
^{14}C libéré/ ^{14}C assimilé (%)	0,33	0,21	0,26	0,27	0,29	0,34	0,32	0,31	0,40	0,42

TABLEAU II

Poids sec et activité spécifique des plants de Maïs à 31 jours (expérience de longue durée).

Poids secs (grammes)	Racines	Tiges	Feuilles
	1,04	1,59	3,51
$^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\mu\text{ci/g}$)	31,61	30,88	35,30

Dans le tableau II sont indiqués les résultats des analyses effectuées sur les végétaux en fin d'expérience. Comme SAUERBECK et FUHR (1966 b) l'avaient constaté avec des plants de Maïs sensiblement du même âge, il n'y a pas une activité spécifique uniforme des feuilles, tiges et racines. Alors que le carbone des feuilles a atteint l'activité spécifique du gaz injecté, les racines et tiges présentent un « déficit

de marquage » qui est respectivement de 29 mg pour les racines et de 68 mg pour les tiges. Ce déficit peut provenir du carbone stable de la graine et du carbone assimilé par les plantules avant mise sous $^{14}\text{CO}_2$, qui auraient migré préférentiellement vers ces deux organes. Remarquons que le carbone de la graine représente à lui seul un apport de 108 mg (poids moyen des graines = 270 ± 10 mg avec une teneur en carbone stable de 40 %).

DISCUSSION

On peut tirer deux séries de conclusions de ces premiers résultats.

1^o Évolution du carbone libéré par les racines

a) Durant une période de 24 heures

Au cours d'une journée comportant une période lumineuse et une période obscure, le carbone rejeté par les racines dans un milieu stérile maintenu à température constante ne subit pas de changements brusques. En particulier l'absence de lumière et la baisse de température concomitante au niveau des parties aériennes n'amènent aucune fluctuation importante des quantités de ^{14}C soluble libéré dans le milieu. Il semblerait même (tableau III) que le bilan horaire net de la radio-

TABLEAU III

Bilans horaires du ^{14}C dans le milieu nutritif lors d'une expérience de courte durée (14 heures de jour-10 heures de nuit) (Moyenne de 4 pots).

Age des plantes Période	55 j.	62 j.
	Jour	4093 dpm/heure
Nuit	5063 dpm/heure	5113 dpm/heure

activité dans la solution soit plus élevé durant la nuit. Ceci est contraire à ce qui se passe pour le dégagement de CO_2 dont on sait qu'il est plus faible durant une période de non éclairage (NEALES et DAVIES, 1966; OSMAN, 1971) et donc sans doute le rejet par les racines de composés solubles serait moins en relation directe avec l'assimilation du carbone et surtout avec la migration des photosynthétats, comme d'ailleurs suggéré par ROVIRA et MACDOUGALL (1967).

Des rythmes de libération pourraient exister pour des substances particulières comme l'ont montré différents auteurs (RICHTER *et al.*, 1968; DUBROV et BULYGINA, 1968; TAFURI *et al.*, 1970), mais des séparations plus fines seraient nécessaires pour les mettre en évidence dans nos expériences. De telles séparations permettraient sans doute également de mettre en relation le rejet du carbone et les variations de certains processus se déroulant dans la rhizosphère tels que la fixation de l'azote.

b) Au cours de la croissance des plantes

Les bilans journaliers du carbone originaire des racines augmentent très rapidement chez le Maïs entre le onzième jour et le trentième jour après le semis. Ce fait est à mettre en relation avec l'accroissement très rapide du système racinaire de cette espèce à cette période et avec l'augmentation très importante de surface qui en résulte (MANORIK et BELIMA, 1969).

La fraction insoluble est toujours très largement inférieure à la fraction soluble, ce qui est contraire aux affirmations de BOWEN et ROVIRA (1973). Alors que ces auteurs avaient obtenu trois à quatre fois plus de produits insolubles que de composés solubles, nous avons mesuré régulièrement cinq fois moins de débris restant sur la membrane filtrante de $0,22 \mu$. On peut penser qu'avec les conditions de culture non drastiques employées on a lésé les racines au minimum ce qui expliquerait cette contradiction. Il serait d'ailleurs intéressant comme BARBER et GUNN (1974), de déterminer avec précision l'influence traumatisante de milieux solides de composition connue. Le rôle exact de la fraction insoluble dans les conditions naturelles pourrait alors être élucidé, et notamment sa participation à l'accroissement de la matière organique (SAMSEVITCH, 1971).

2^o Relations entre l'assimilation du CO_2 et le rejet de carbone par les racines

Le ^{14}C libéré sous forme de composés solubles représente environ 0,3 à 0,4 % du ^{14}C assimilé journalièrement dans l'expérience de longue durée avec des plantes de 11 à 31 jours (tableau I). Ces rapports sont comparables à ceux donnés par MARTIN (1971) et ROVIRA et MACDOUGALL (1967), ROVIRA et RIDGE (1973), obtenus après marquage par une injection brève de $^{14}\text{CO}_2$ (pulse labelling). Par contre dans l'expérience sur des plantes âgées de 55 et 62 jours, ce rapport est de l'ordre de 0,7 % environ, ce qui tendrait à montrer que les racines âgées ont une plus forte capacité à libérer du carbone.

L'existence d'une relation directe entre les quantités journalières de carbone assimilé par voie photosynthétique et rejeté par les racines sous forme de composés solubles (voir *fig. 7*) permet de faire des estimations du développement de la microflore rhizosphérique en fonction de la photosynthèse. Si l'on se base par exemple sur les calculs de BOWEN et ROVIRA (1973) qui ont estimé qu'à 1 mg de carbone dans la zone autour des racines correspondait le développement d'environ 2×10^6 cellules bactériennes, on arrive dans nos expériences avec la relation de la figure 7, à environ 10^5 cellules « potentielles » dans la rhizosphère du Maïs par 10^6 désintégrations/minute de ^{14}C assimilé par photosynthèse. En prenant les résultats réels de l'expérience, on trouve par exemple environ $0,6 \times 10^5$ micro-organismes au deuxième jour (plantules de 13 jours) ou $0,9 \times 10^6$ au douzième jour (plantules de 23 jours).

Ces résultats doivent être considérés comme indicatifs, mais complétés par des études des sites de rejet des produits solubles et du développement racinaire, ils devraient permettre d'envisager une « description quantitative de l'écosystème rhizosphère », description qui n'a encore pu être entreprise jusqu'ici.

REMERCIEMENTS

Nous remercions P. THIBAUT qui a bien voulu revoir l'aspect mathématique de ce travail et A. DIMON qui a assuré la majorité des analyses.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDRÉ M., NERVI J. C., LESPINAT P. A. et MASSIMINO D., 1974. — Units for automatic culture in artificial atmosphere "C2 3A" project. *Acta Horticulturæ*, 39, 59-72.
- BALANDREAU J., WEINHARD P., RINAUDO G. et DOMMERGUES Y., 1971. — Influence de l'éclaircissement de la plante sur la fixation non symbiotique de l'azote dans sa rhizosphère. *Écol. Plant.*, 6, 341-351.
- BARBER D. A. et GUNN K. B., 1974. — The effect of mechanical forces on the exudation of organic substances by the roots of cereal plants grown under sterile conditions. *New Phytol.*, 73, 39-45.
- BOWEN G. D. et ROVIRA A. D., 1973. — Are modelling approaches useful in Rhizosphere biology. *Bull. Ecol. Res. Comm.* (Stockholm), 17, 443-450.
- DUBROV A. P. et BULYGINA E. V., 1967. — Rhythms in the secretion of organic compounds by cereal roots. *Soviet Plant Physiol.*, 14, 247-263.
- HAGEMAN R. H., FLESHER J. J. et STORCK D. H., 1962. — An improved nutrient culture technique for growing Corn under greenhouse conditions. *Agron. J.*, 53, 175-180.
- HAMLEN R. A., LUZEKIC F. L. et BLOOM J. R., 1972. — Influence of age, stage of development on the neutral carbohydrates components in root exudates from Alfalfa plants grown in a gnotobiotic environment. *Can. J. Plant Sc.*, 52, 633-642.
- HOAGLAND D. R. et ARNON D. J., 1950. — The water culture method for growing plants without soil. *Calif. agric. exp. Sta.*, Cir., 347.
- MACDOUGALL B., 1970. — Movement of ^{14}C -photosynthate into the roots of Wheat seedlings and exudation of ^{14}C from intact roots. *New Phytol.*, 69, 37-46.
- MANORIK A. V. et BELIMA N. I., 1969. — Method of studying root exudates and of calculating their amounts. *Soviet Plant Physiol.*, 16, 358-364.
- MARTIN J. K., 1971. — ^{14}C -labelled material leached from the rhizosphere of plant supplied with $^{14}\text{CO}_2$. *Austr. J. Biol. Sc.*, 24, 1131-1142.
- MESKHOV N. B., 1961. — Contenu en carbone total des excréments racinaires de plantes cultivées en conditions stériles sur solutions nutritives permanentes ou renouvelées. *Izv. Akad. Nauk. SSSR*, sér. Biol., 3, 352-361 (en russe).
- MURRAY J., 1971. — Liquid scintillation counting of $^{14}\text{CO}_2$ in a toluene/triton X-100 system. *Int. J. app. Rad. Isot.*, 22, 209-212.
- NEALES T. F. et DAVIES J. A., 1966. — The effect of photoperiod upon the respiratory activity of the roots of Wheat seedlings. *Aust. J. Biol. Sc.*, 19, 471-480.
- NECHIPORENKO G. A. et IVANOV V. P., 1973. — Elimination and uptake of ^{14}C labelled organic substances and carbon dioxide by Corn and Bean roots. *Soviet Plant Physiol.*, 22, 484-487.
- OSMAN A. M., 1971. — Root respiration of Wheat plants as influenced by age, temperature and irradiation of shoots. *Photosynthetica*, 5, 107-112.
- PRONIN V. A. et VORONKAVA F. V., 1973. — A technique for investigation of root exudates of higher plants. *Soviet Plant Physiol.*, 20, 174-177.
- RICHTER M., WILMS W. et SCHEFFER F., 1968. — Determination of root exudates in a sterile continuous flow-culture. II. Short-term variations of exudation intensity. *Plant Physiol.*, 43, 1747-1754.
- ROVIRA A. D. et MACDOUGALL B., 1965. — Carbon-14 labelled photosynthate in Wheat root exudates. *Nature*, London, 5001, 1104-1105.
- ROVIRA A. D. et MACDOUGALL B., 1967. — Microbiological and biochemical aspects of the rhizosphere. In *Soil Biochemistry*, A. D. MACLAREN et G. H. PETERSON éd., M. Dekker, New York, 417-463.

- ROVIRA A. D. et RIDGE E. H., 1973. — Exudation of ^{14}C -labelled compounds from Wheat roots : Influence of nutrients, microorganisms and added organic compounds. *New Phytol.*, 72, 1081-1087.
- SAMSEVITCH S. A., 1971. — Root excretion of plants. An important source of humus formation in the soil. Studies about humus. *Translations of the International Symposium Humus and Planta*, V, Prague, 13-17 septembre 1971, 147-154.
- SAUERBECK D. et FUHR F., 1966 a. — The interference of carbon-14 labelled carbon dioxide in studies on the uptake of organic substances by plant roots. *Rep. FAO/AIEA Techn. Meet. Use Isotopes Soil Organ. Matter Studies*, Brunswick, 1963, Pergamon Press, Oxford, 1966, 61-71.
- SAUERBECK D. et FUHR F., 1966 b. — Experiences on labelling whole plants with carbon-14. *Rep. FAO/AIEA Techn. Meet. Use Isotopes Soil Organ. Matter Studies*, Brunswick, 1963, Pergamon Press. Oxford, 1966, 391-399.
- SHAY F. J. et HALE M. G., 1973. — Effect of low levels of calcium on exudation of sugars derivatives from intact Peanut roots under axenic conditions. *Plant Physiol.*, 51, 1061-1063.
- STOTSKY G., CULBRETH W. et MISH L. B., 1961. — Apparatus for growing plants with aseptic roots for collection of roots exudates and CO_2 . *Plant Physiol.*, 37, 332-341.
- TAFURI F., BUSINELLI M. et GUIQUIANI P. L., 1970. — Ritmo endogeno dell'escrescenza radicale di sostanze organiche nelle leguminose. *Agrochimica*, 15, 52-60.
- TARDIEUX-ROCHE A. et TARDIEUX P., 1970. — La biosynthèse des phosphates condensés par la microflore du sol et son rôle dans la nutrition des végétaux. *Ann. Agron.*, 21, 305-314.
- TUKEY H. B., Jr., 1969. — Implications of allelopathy in agricultural plant science. *Bot. Rev.*, 35, 1-16.
- VANCURA V. et HANZLIKOVA A., 1972. — Root exudates of plants. IV. Differences in chemical composition of seed and seedling exudates. *Plant and Soil*, 36, 271-282.
- WAREMBOURG F. R. et PAUL E. A., 1973. — The use of $^{14}\text{CO}_2$ canopy technique for measuring carbon transfer through the soil-plant system. *Plant and Soil*, 38, 331-345.