

UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH  
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MAHRAZ  
FES

---

**THESE**

Présentée

Pour obtenir

**Le Grade de DOCTEUR D'ETAT**

**ès SCIENCES**

Discipline: **PHYSIOLOGIE VEGETALE**

Par

**Mohammed BENDRISS AMRAOUI**

---

**SUJET:** Contribution à l'étude du métabolisme du  
nitrate chez quelques variétés marocaines de blé  
tendre

**Soutenue le 16 février 2002**

devant la commission d'examen composée de:

<b>MM. Ahmed TALOUIZTE</b>	Professeur	Fac. Sc. Dhar el Mahraz Fès	<b>Président</b>
Mohamed <b>BENBELLA</b>	Professeur	E. N. A. de Meknès	<b>Rapporteur</b>
Mohamed <b>ISMAILI</b>	Professeur	Fac. Sc. de Meknès	<b>Rapporteur</b>
Yamina <b>MSATEF</b>	Professeur	Fac. Sc. Dhar el Mahraz Fès	<b>Examineur</b>
Abdelhamid <b>ZAID</b>	Professeur	Fac. Sc. de Meknès	<b>Examineur</b>

## Résumé

La croissance, l'absorption, la réduction, le métabolisme du  $\text{NO}_3^-$  et du carbone ainsi que l'exsorption du  $\text{NO}_3^-$  et des sucres ont été examinés chez quatre variétés marocaines de blé tendre (*Triticum aestivum* L. var. Achtar, Saâda, Saba et Tegye<sup>32</sup>). Après germination, les plantules sont cultivées en conditions contrôlées sur solution nutritive jusqu'au stade 21 jours. L'azote minéral est fourni aux plantules exclusivement sous forme de nitrates. Les résultats obtenus permettent de distinguer les quatre variétés au niveau de l'élongation foliaire, la réduction du nitrate et le métabolisme du  $\text{NO}_3^-$  et du carbone ainsi que l'exsorption du nitrate sur sels. Les données montrent un effet des sels ( $\text{KCl}$  et  $\text{CaCl}_2$ ), de l'eau et de la lumière sur l'exsorption du nitrate. L'examen de l'exsorption du nitrate en parallèle avec celle des sucres montre qu'elles se font par des systèmes différents mais sont par contre liées indirectement par la lumière et les processus de la translocation phloémique, de la respiration et de l'assimilation du nitrate. Selon les expériences de défoliation, l'exsorption est stimulée par les feuilles immatures (F3 et F4) et l'apex, par contre elle est inhibée par les feuilles matures (F1 et F2). La comparaison inter-variétal montre que l'exsorption des nitrates est conjointement régulée par les racines et la partie aérienne et que ce contrôle est influencé par les sels et la lumière. A l'obscurité, la comparaison de l'exsorption des plantes privées de F1 et F2 avec celle des plantes intactes montre que les feuilles matures contribuent aussi dans la régulation de l'exsorption racinaire par l'apex. Ces feuilles sont soupçonnées soutenir cette régulation à l'obscurité en supportant la synthèse des substances impliquées dans ce contrôle. L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'une coordination intra et inter-organaire de l'exsorption en parallèle avec les facteurs du milieu. Ces résultats peuvent servir de préalable à l'étude du mécanisme de l'efflux et des gènes qui le gouvernent ainsi que dans la sélection variétale pour les meilleures performances en efficacité d'utilisation, de rétention et de stockage du nitrate à un stade végétatif précoce chez le blé tendre.

**Mots clés:** blé tendre; métabolismes du  $\text{NO}_3^-$  et du carbone; exsorption; régulation; variétés

## **Dédicace**

A la mémoire de mon père El Mehdi BenDriss Amraoui

A ma mère et toute ma famille

A mon épouse Siham

A mes enfants Mehdi et Samia

## **Remerciements**

Dans ce mémoire sont réunies les résultats de recherches effectuées dans le laboratoire de Physiologie végétale du département de Biologie de la faculté des Sciences Dhar el Mahraz de Fès sous la direction du Professeur Ahmed Talouizte. Je tiens à le remercier pour avoir pris part à l'initiation des recherches décrites dans ce mémoire et pour avoir mis à ma disposition son expérience scientifique et sa compétence. Je le remercie également pour avoir présider la commission d'examen.

Le Professeur Mohamed Benbella de l'Ecole Nationale d'Agronomie (Meknès) et le Professeur Mohamed Ismaili de la Faculté des Sciences (Meknès) ont acceptés d'être rapporteurs de ce travail qu'ils soient vivement remerciés pour la responsabilité et l'effort qu'ils ont déployé à mon égard malgré leurs multiples occupations.

Je remercie également le Professeur Yamina Msatef de la faculté des Sciences Dhar el Mahraz (Fès) et le Professeur Abdelhamid Zaid de la faculté des Sciences (Meknès) pour avoir accepter de juger ce travail.

Je n'oublie pas non plus de remercier les autres personnes qui m'ont aidé ou soutenu au cours de la préparation de ce mémoire.

Enfin, au cours de toutes ces années, j'ai beaucoup apprécié le soutien et l'indulgence de ma femme, Siham et mes enfants Mehdi et Samia.

## Résumé

La croissance, l'absorption, la réduction, le métabolisme du  $\text{NO}_3^-$  et du carbone ainsi que l'exsorption du  $\text{NO}_3^-$  et des sucres ont été examinés chez quatre variétés marocaines de blé tendre (*Triticum aestivum* L. var. Achtar, Saâda, Saba et Tegye<sup>32</sup>). Après germination, les plantules sont cultivées en conditions contrôlées sur solution nutritive jusqu'au stade 21 jours. L'azote minéral est fourni aux plantules exclusivement sous forme de nitrates. Les résultats obtenus permettent de distinguer les quatre variétés au niveau de l'élongation foliaire, la réduction du nitrate et le métabolisme du  $\text{NO}_3^-$  et du carbone ainsi que l'exsorption du nitrate sur sels. Les données montrent un effet des sels ( $\text{KCl}$  et  $\text{CaCl}_2$ ), de l'eau et de la lumière sur l'exsorption du nitrate. L'examen de l'exsorption du nitrate en parallèle avec celle des sucres montre qu'elles se font par des systèmes différents mais sont par contre liées indirectement par la lumière et les processus de la translocation phloémique, de la respiration et de l'assimilation du nitrate. Selon les expériences de défoliation, l'exsorption est stimulée par les feuilles immatures (F3 et F4) et l'apex, par contre elle est inhibée par les feuilles matures (F1 et F2). La comparaison inter-variétal montre que l'exsorption des nitrates est conjointement régulée par les racines et la partie aérienne et que ce contrôle est influencé par les sels et la lumière. A l'obscurité, la comparaison de l'exsorption des plantes privées de F1 et F2 avec celle des plantes intactes montre que les feuilles matures contribuent aussi dans la régulation de l'exsorption racinaire par l'apex. Ces feuilles sont soupçonnées soutenir cette régulation à l'obscurité en supportant la synthèse des substances impliquées dans ce contrôle. L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'une coordination intra et inter-organaire de l'exsorption en parallèle avec les facteurs du milieu. Ces résultats peuvent servir de préalable à l'étude du mécanisme de l'efflux et des gènes qui le gouvernent ainsi que dans la sélection variétale pour les meilleures performances en efficacité d'utilisation, de rétention et de stockage du nitrate à un stade végétatif précoce chez le blé tendre.

**Mots clés:** blé tendre; métabolismes du  $\text{NO}_3^-$  et du carbone; exsorption; régulation; variétés

## Abstract

The growth,  $\text{NO}_3^-$  uptake and reduction,  $\text{NO}_3^-$  and sugar metabolisms as well as  $\text{NO}_3^-$  and sugar exorptions have been examined in four Moroccan wheat cultivars (*Triticum aestivum* L. cv. Achtar, Saâda, Saba and Tegye32). After germination, the seedlings are cultivated in controlled conditions on nutrient solution until the stage of 21 days. The nitrogen is supplied to seedlings in nitrate form. Data allow us to distinguish the four cultivars in leaf elongation, nitrate reduction,  $\text{NO}_3^-$  and sugar metabolisms and nitrate exorption in salts. The results show an effect of salts (KCl and  $\text{CaCl}_2$ ), of water and of light on exorption. The examination of  $\text{NO}_3^-$  and sugar exorptions shows that the two losses occur by different systems but are indirectly linked by light, phloemic translocation, respiration and nitrate assimilation. Defoliation experiments show that the exorption is stimulated by the immature leaves (F3 and F4) and the apex, whereas it is inhibited by the mature leaves (F1 et F2). The inter-varietal comparison shows that nitrate exorption is conjointly regulated by roots and shoots and that this control is influenced by salts and light. In the Darkness, the comparison of nitrate losses from deprived plants of F1 and F2 and intact plants shows that the mature leaves also contribute in the apex regulation of root nitrate exorption. The mature leaves are suspected to sustain this regulation in darkness by supporting the synthesis of substances that are implied in this control. Collectively, these results suggest the existence of intra and inter-organ coordination of exorption in parallel with factors of medium and may serve as a prior to the study of efflux mechanism and executive genes of efflux as well as in varietal selection for the best performances in nitrate use efficiency and nitrate retention and storage at a precocious vegetative stage in soft wheat.

**Key words:** soft wheat;  $\text{NO}_3^-$  and carbon metabolisms; exorption; regulation; cultivars

## TABLE DE MATIERE

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>PARTIE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. Introduction</b> .....	5
<b>II. Absorption des nitrates</b> .....	6
II. 1. Système de l'influx .....	6
II. 2. Système de l'efflux .....	11
II. 2. 1. Efflux à partir de la vacuole .....	11
II. 2. 2. Efflux à partir du cytoplasme .....	14
<b>III. Régulation de l'absorption des nitrates</b> .....	18
III. 1. Régulation par le nitrate, l'influx et l'efflux .....	19
III. 2. Régulation par les produits du métabolisme du nitrate .....	20
III. 3. Régulation par les acides organiques .....	24
III. 4. Régulation par les glucides .....	28
III. 5. Régulation par la lumière et le rythme circadien .....	30
III. 6. Régulation par les différents organes de la plante .....	40
III. 6. 1. La partie racinaire .....	40
III. 6. 2. La partie aérienne .....	42
III. 7. Régulation par la croissance .....	48
<b>IV. Assimilation des nitrates</b> .....	52
IV. 1. La nitrate réductase .....	55
IV. 2. La nitrite réductase .....	56
<b>V. Régulation de la NR et la NiR</b> .....	56
V. 1. L'azote, le carbone et la lumière .....	56
V. 2. Le malate et le 2-oxoglutarate .....	70
V. 3. Le rythme circadien .....	71
V. 4. Les hormones .....	72
<b>VI. Conclusion et objectifs</b> .....	72

## **PARTIE II: RESULTATS ET DISCUSSION**

### **CHAPITRE 1: Analyse comparative de paramètres morphophysiologiques au stade jeune de quatre géotypes marocains de blé tendre (*Triticum aestivum* L. var. Ahtar, Saâda, Saba et Tegye<sup>32</sup>)**

Résumé .....	79
Introduction .....	80
Matériels et méthodes .....	81
Résultats et discussion .....	83
Conclusion .....	87
Références bibliographiques .....	88

### **CHAPITRE 2: Etude du métabolisme des nitrates chez quatre géotypes marocains de blé tendre (*Triticum aestivum* L. var. Ahtar, Saâda, Saba et Tegye<sup>32</sup>)**

Résumé .....	95
Introduction .....	96
Matériels et méthodes .....	97
Résultats .....	98
Discussion et conclusion .....	99
Références bibliographiques .....	101

### **CHAPITRE 3: Absorption et assimilation des nitrates chez quatre géotypes marocains de blé tendre (*Triticum aestivum* L. var. Ahtar, Saâda, Saba et Tegye<sup>32</sup>)**

Résumé .....	106
Introduction .....	107
Matériels et méthodes .....	108
Résultats .....	111
Discussion .....	113
Conclusion .....	121
Références bibliographiques .....	123



**CHAPITRE 4: Salts in the root zone affect  $\text{NO}_3^-$ -N losses from wheat root****in light: Influence of genotypes and darkness**

Résumé .....	133
Abstract .....	134
Introduction .....	135
Materials and methods .....	136
Results and discussion .....	138
References .....	143

**CHAPITRE 5: Effects of an ionic and hypo-osmotic treatments on  $\text{NO}_3^-$** **losses: Influence of light and genotype**

Résumé .....	152
Abstract .....	153
Introduction .....	154
Materials and methods .....	155
Results and discussion .....	156
References .....	163

**CHAPITRE 6:  $\text{NO}_3^-$  affects carbohydrate losses from wheat roots**

Résumé .....	171
Abstract .....	172
Introduction .....	173
Materials and methods .....	175
Results and discussion .....	177
References .....	182

**CHAPITRE 7: Influence of genotype and salt at physiological****concentration on the shoot control of root  $\text{NO}_3^-$  efflux**

Résumé .....	193
Abstract .....	194
Introduction .....	195
Materials and methods .....	197
Results and discussion .....	199
References .....	210

**CHAPITRE 8: The mature leaves may be the site of AIA metabolite  
accumulation involved in the apex control of  $\text{NO}_3^-$  efflux in darkness:  
Influence of KCl-salt, and genotype**

Résumé .....	227
Abstract .....	228
Introduction .....	229
Materials and methods .....	230
Results and discussion .....	232
References .....	238
<b>PARTIE III: CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>245</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>255</b>

## Introduction générale

Comme dans la plupart des pays en voie de développement, le secteur céréalier occupe une large place dans l'économie du maroc. En effet, ce secteur joue un rôle primordial dans la structure de la production agricole par l'importance des superficies qu'il occupe et par son poids dans la sécurité alimentaire du pays (M'sehli, 1999). Toutefois, le faible recours à l'irrigation rend ce secteur tributaire des variations climatiques et rend le maroc, malgré sa vocation agricole, un client potentiel à l'échelle mondiale.

La fertilisation azotée figure parmi les intrants dont l'utilisation a fortement progressé, car elle constitue, après l'eau, l'un des facteurs limitants le plus important de la production végétale. Au cours de ces dernières décennies, des progrès considérables ont été réalisés dans le domaine agricole. Ils sont dus, pour une large part, à l'amélioration génétique des variétés, à la mécanisation ou encore à l'augmentation des intrants industriels (fertilisants, produits phytosanitaires, Recous et al., 1997). Malheureusement, bien que ces progrès aient permis de dépasser les besoins alimentaires ils sont à l'origine de deux problèmes majeurs à l'échelle mondiale. Le premier est d'ordre écologique. L'utilisation massive des engrais nitriques dans les nouvelles pratiques culturales sans connaître ni les ressources réelles du sol en azote qui échappent à tout contrôle par l'homme ni quelles seront les conditions climatiques de l'année constitue l'une des causes majeures de pollution des eaux et de l'air par l'azote (pollution de l'eau par le nitrate et de l'air par l'ammoniac et le protoxyde d'azote, Martin et Meynard, 1997). Le second est d'ordre économique. L'azote peut représenter jusqu'à la moitié du coût de production en céréaliculture (Martin et Meynard, 1997).

Afin de gérer correctement la fertilisation azotée des cultures et minimiser les risques pour l'environnement il est important de connaître les entrées et les sorties d'azote dans le système sol-plante. Malheureusement, les quantités d'azote apportées par les fertilisants organiques (déjections animales, fumier, résidus de récoltes,...) sont souvent connues de façon approximative. Les quantités d'azote minéral présentes dans le sol à un instant donné, qui sont donc potentiellement utilisables par les cultures et/ou susceptibles d'être lessivées, sont pour le moment estimées avec une certaine imprécision. Des efforts considérables de recherche et d'analyse restent encore nécessaires à développer sur les capacités en azote organique et inorganique des sols provenant des exsudats et résidus de cultures ainsi que des effluents issus des activités de l'homme en interaction avec les caractéristiques du milieu (climat, sol).

L'application de techniques agronomiques modernes (ajustement des apports d'azote au strict besoin de la culture, travail du sol, irrigation et fertilisation, ....) permettent déjà de réduire considérablement les pertes de nitrate (Meynard, 1985; Powlson et al., 1986; Sebillotte et Meynard, 1990; Mary et Guérif, 1994; Justes, 1993; Justes et al., 1994; Ryan et al., 1994; Martin et Meynard, 1997; Bouaziz et Soudi, 1998; Vuilliot et al., 1998). Cependant, dans certaines situations pédoclimatiques, pour des raisons d'inadaptation de certains outils de diagnostic ou de prévision des quantités d'azote qui vont être disponibles non seulement pendant le cycle cultural, mais également sur l'ensemble d'une succession de culture, la pollution nitrique est aujourd'hui loin d'être maîtrisée. La stratégie d'utilisation de variétés améliorées dans l'efficacité de capture et de stockage de l'azote peut s'avérer nécessaire (Ryan et al., 1989; Mossaddaq, 1990; Karrou, 1992, 1996).

L'essentiel du travail présenté dans ce mémoire s'inscrit dans le cadre des recherches effectuées sur l'évaluation des potentialités physiologiques des céréales pour les exploiter dans l'amélioration du rendement. L'objectif de cette étude est de caractériser quatre variétés marocaines de blé tendre du point de vue potentialités d'utilisation du nitrate. Ainsi, notre travail a porté en premier lieu sur l'étude de certains caractères morphologiques et physiologiques (**chapitres 1 et 2**) susceptibles d'influencer les processus biochimiques (l'absorption et l'assimilation du nitrate) impliqués dans le prélèvement, la transformation et le stockage du nitrate (**chapitre 3**) chez quatre variétés marocaines de blé tendre. Les faibles capacités d'absorption du nitrate obtenues chez ces variétés nous a poussé à étudier les pertes (efflux) de nitrates par ces variétés dans différentes conditions (lumière, obscurité, eau, KCl et CaCl<sub>2</sub>, **chapitres 4 et 5**) afin de trouver des explications au comportement de nos variétés. L'étude de l'influence du nitrate sur la perte (efflux) des sucres (**chapitre 6**) nous a permis de démontrer l'existence d'une régulation de l'efflux du nitrate et de l'efflux des sucres par la lumière en interaction avec le nitrate, suggérant l'existence d'une dépendance de l'efflux du nitrate de la partie aérienne via l'assimilation du nitrate. Pour cette raison, l'impact de la partie aérienne dans la régulation de l'efflux du nitrate a été également abordé chez ces variétés (**chapitres 7 et 8**). L'ensemble de ces résultats nous a permis d'améliorer nos connaissances sur le mécanisme de l'efflux du nitrate et sa régulation par certains facteurs exogènes et endogènes chez le blé au stade plantule. La comparaison inter-variétale nous a permis de mettre en évidence l'existence d'une régulation de l'efflux par les racines et par la partie aérienne. Elle a permis aussi de dégager l'existence d'une implication des feuilles matures dans la synthèse de substances (probablement des auxines) responsables de la régulation de l'efflux par l'apex. Finalement, ces résultats peuvent servir pour une approche

rationnelle à la sélection variétale pour les meilleures performances en efficacité d'utilisation, de rétention et de stockage du nitrate à un stade végétatif précoce.

# **PARTIE I**

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

*Recent research shows that signals derived from nitrate are involved in triggering widespread changes in gene expression, resulting in a reprogramming of nitrogen and carbon metabolism to facilitate the uptake and assimilation of nitrate, and to initiate accompanying changes in carbon metabolism. These nitrate-derived signals interact with signals generated further downstream in nitrogen metabolism, and in carbon metabolism. Signals derived from internal and external nitrate also adjust root growth and architecture to the physiological state of the plant, and the distribution of nitrate in the environment.*

*(D'après Mark Stitt, 1999)*

## I. Introduction

L'azote est l'un des éléments constitutifs les plus importants pour les végétaux et tous les êtres vivants. Les phanérogames, dont la croissance est limitée par la nutrition azotée et la disponibilité de l'azote dans le sol, ont à leur disposition trois sources principales d'azote inorganique: le nitrate, l'ammoniaque et l'azote moléculaire atmosphérique. Le nitrate constitue la source la plus importante pour de nombreux végétaux cultivés. Un apport massif ou non de nitrate constitue un gaspillage pour l'agriculteur et une menace de pollution pour l'environnement si cet apport ne coïncide pas avec les besoins du végétal, les bonnes conditions climatiques (souvent imprévisibles), le bon choix de la plante et un itinéraire technique approprié.

Le souci de résoudre ces problèmes d'ordres économiques et écologiques causés par la fertilisation intense des sols ainsi que de régulariser les rendements a poussé l'agronome à l'application de techniques agronomiques modernes qui ont déjà permis de réduire considérablement les pertes de nitrate. Cependant, la reconsidération des potentialités physiologiques des plantes et l'élaboration de variété plus économe en azote, dont l'efficacité d'utilisation et de rétention de l'azote est élevée, peut constituer aussi un moyen d'action par lequel le généticien et le physiologiste pourraient contribuer dans la protection de l'environnement. De ce fait, l'acquisition d'une connaissance approfondie des différents aspects (physiologique, biochimique et moléculaire) des mécanismes de transports, d'assimilation et de gestion de l'azote par la plante est indispensable.

Les résultats acquis ces dernières décennies sur les végétaux ont permis d'établir nos connaissances sur les premières étapes du métabolisme de l'azote inorganique au niveau moléculaire, cellulaire et de l'organisme. Les principaux axes de recherches développés concernent: le transport du nitrate et de l'ammoniac à travers le plasmalemmme (Jackson, 1978; Kleiner, 1981; BenDriss Amraoui, 1988; Wang et al., 1993, 1994; Mäck et Tischner, 1994; Kronzucker et al., 1995; Glass et Siddiqi, 1995), la réduction du nitrate, l'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  et la biosynthèse des acides aminés (Lea et Mifflin, 1974; Mifflin et Lea, 1977, 1980; Keys et al., 1978; Beevers et Hageman, 1980; Martin et BenDriss Amraoui, 1986; Joy, 1988), la répartition du nitrate et des acides aminés entre les différents pools cellulaires (Oaks et Gadal, 1979; Martin et BenDriss Amraoui, 1989; Siddiqi et al., 1991), le transport des métabolites azotés vers les organes aériens et la redistribution de l'azote dans la plante entière (Huffaker et Rains, 1978, Hartman, 1979; Hill-Cottingham et Lloyd-Jones, 1979; BenDriss Amraoui, 1988; Martin et BenDriss Amraoui, 1989). Cet ensemble de processus a été décrit en détail, et quand il est considéré dans son intégralité, il met en évidence l'importance

fondamentale des phénomènes de transports entre organes, entre cellules et organites, mais aussi entre la racine et le milieu.

## **II. Absorption des nitrates**

Au niveau de la racine, le nitrate peut être absorbé selon deux voies. Une voie apoplasmique qui correspond à une diffusion de l'ion entre les cellules racinaires. Une voie symplasmique qui correspond à la pénétration de l'ion dans les cellules (Rufty et al., 1986). L'absorption nette est le résultat de deux flux unidirectionnels de sens opposé: l'influx et l'efflux (Morgan et al., 1973; Deane-Drummond, 1982; Deane-Drummond, 1984; Lee et Clarkson, 1986; Lee et Drew, 1986; Talouizte et al., 1989, 1990; Devienne et al., 1994). Toute variation de l'influx ou de l'efflux, séparément ou simultanément peut provoquer une variation de l'absorption nette des nitrates. Si l'efflux est nul ou élevé, l'absorption nette est égale ou inférieure à l'influx, respectivement (Talouizte et al., 1990). Si l'absorption nette et l'efflux sont élevés (Bowman et al., 1998) l'influx doit être automatiquement élevé et si l'absorption nette et l'efflux sont faibles l'influx doit être faible aussi (Bowman et al., 1998). Ce dernier cas existe chez les espèces et les génotypes supposés avoir une meilleure efficacité d'absorption des nitrates (Bowman et al., 1998). Quand l'influx et l'efflux varient dans le même sens l'absorption reste constante (Lejay et al., 1999).

### **II. 1. Système de l'influx**

L'entrée du nitrate dans le symplasma (influx) est active du fait qu'elle s'effectue contre un gradient électrochimique nécessitant que le transporteur ou le mécanisme de transport du nitrate soit soutenue métaboliquement (Butz et Jackson, 1977; Ullrich et Novacky, 1981; Thibaud et Grignon, 1981; Talouizte et al., 1989; Santi et al., 1995). Ce transport actif du nitrate est stimulé par la température, les fortes teneurs en photosynthétats, la lumière et la composition cationique du milieu en particulier l'ion potassium. Il est bloqué par les inhibiteurs de la synthèse des protéines et de l'ARN (Key, 1966; Jackson et al., 1973; Poole, 1978; Tompkins et al., 1978; Cacco et al., 2000) ainsi que les poisons du métabolisme cellulaire tels que la puromycine, la 6-méthylpurine, le cyanure (Jackson et al., 1973). L'entrée des nitrates est catalysée par des transporteurs protéiques plasmalemmiques couplés à une pompe à proton (Santi et al., 1995; Miller et Smith, 1996; Clarkson, 1998). Le transporteur utilise un gradient de proton engendré et maintenue par la pompe à  $H^+$  ( $Mg^{2+}$ -ATPase) qui expulse les  $H^+$  vers le milieu extérieur (Ullrich et Guern, 1990; Santi et al., 1995; Clarkson, 1998; Pouliquin et al., 2000), les nitrates entrent dans le symplasma racinaire par un système d'antiport  $NO_3^-/OH^-$  ou son équivalent physiologique le symport  $NO_3^-/H^+$  (Ruiz-



Cristin et Briskin, 1991). Le retour de  $H^+$  ou l'efflux de  $OH^-$  entraîne l'entrée de  $NO_3^-$  et l'alcalinisation de la solution.

L'excès de  $OH^-$  non excrété issu de la réduction du nitrate ou d'un faible influx d'anions (Talouizte et al., 1989) est neutralisé dans la cellule par le système du pHstat biochimique de Davies (Davies, 1986). Ce système intervient aussi lorsqu'un échange rapide  $NO_3^-/OH^-$  provoque une diminution du pH cytoplasmique (Talouizte et al., 1989). Un autre exemple qui illustre l'influence de ce système sur l'absorption a été proposé par Ben-Zioni et al. (1971). Selon ces auteurs, la réduction des nitrates dans les feuilles affecte l'absorption des nitrates par les racines via ce système qui produit du malate dans les feuilles et stimule son transfert et sa décarboxylation dans les racines. Le  $HCO_3^-$  produit par décarboxylation du malate ou provenant de la respiration des racines peut s'échanger avec le  $NO_3^-$  externe. La stoechiométrie du transport de  $NO_3^-$  n'est pas encore déterminée. Le coût énergétique est voisin d'une à trois moles d'ATP par mole de  $NO_3^-$  absorbé quel que soit le type de transport utilisé (Bloom et al., 1992). Le fait que l'entrée du nitrate peut engendrer une dépolarisation (Glass et al., 1992) ou une hyper-polarisation de la membrane (Thibaud et Grignon, 1981) suggère qu'il s'agit soit d'un seul transporteur multiphasique qui change de configuration ou de plusieurs transporteurs du fait que la stoechiométrie du système de transport peut varier.

Deux transporteurs, dont les propriétés cinétiques sont différentes, existent dans la membrane cellulaire: l'un est constitutif et lent, l'autre est rapide et inductible par le nitrate lui-même (Jackson, 1973, Breteler et Nissen, 1982; Nissen et Nissen, 1983, Clarkson, 1986). Le système constitutif permet à la plante d'acquérir le nitrate dès son entrée en contact avec la racine (Siddiqi et al., 1990; Glass et Siddiqi, 1995). Il est peu labile, insensible aux faibles températures et aux inhibiteurs de la synthèse de protéine. Sa grande affinité pour le nitrate lui permet d'absorber l'anion même lorsque celui ci est présent à l'état de trace. Cette caractéristique peut être à l'origine de l'initiation de l'induction du système de transport inductible et du maintien d'un niveau constitutif de la NR qui est aussi induite par le nitrate (Langendorfer, 1988).

L'induction apparente du système d'absorption des nitrates dans les racines dépend de plusieurs facteurs tels que: (1) la présence des cations  $K^+$  et  $Ca^{2+}$  qui intervient dans l'équilibre des charges négatives pouvant faciliter la diffusion des nitrates vers le site de transport (Minotti et al., 1968; Rao et Rains, 1976), (2) les glucides photosynthétiques et de réserves (Jackson et al., 1973, 1976a, 1976b) et (3) le transport des photosynthétats des feuilles vers les racines (Jackson et al., 1976a). La durée d'induction apparente du système d'absorption du  $NO_3^-$  est variable selon les espèces, les conditions de culture et la

concentration en nitrate de la solution (Minotti et al., 1968; Jackson et al., 1973; Breteler et al., 1979; Goyal et Huffaker, 1986; Behl et al., 1988).

Le transporteur induit par le nitrate est très labile et à une demi-vie de l'ordre de 2 à 3 heures (Jackson et al., 1973, Clarkson, 1986). Il nécessite un maintien permanent en énergie qui dépend en partie de la capacité de distribution aux racines des glucides solubles foliaires (Jackson et al., 1976a, 1976b). La contribution des glucides solubles dans l'induction à court (apparente) et à long terme du système d'absorption des nitrates suggère l'existence d'un contrôle continu de type énergétique (ATP) ou synthétique (acide organique et acide aminés) du fonctionnement, de la synthèse et du maintien du système de transport inductif des nitrates dans les racines. La durée nécessaire à l'induction complète est de quelques heures (Jackson et al., 1973; Goyal et Huffaker, 1986; MacKown et McClure, 1988; Giovanni et al., 2000). Elle dépend de l'espèce, des conditions de culture, de la concentration en nitrate de la solution et de la disponibilité en sucres dans les racines (Minotti et al., 1968; Jackson et al., 1973; Neyra et Hageman, 1975; Talouizte et al., 1984a; Champigny et al., 1984; Goyal et Huffaker, 1986). Le système d'absorption inductible entre en action quand l'exposition de la plante au nitrate a été suffisamment longue pour permettre à la concentration de cet ion dans le cytoplasme d'atteindre une valeur-seuil. Cette latence est également suffisante pour que des produits de l'assimilation de  $\text{NO}_3^-$  s'accumulent dans le cytoplasme. De ce fait, il est difficile de connaître avec précision quel est le signal d'induction. Du fait que cette latence peut être éliminée par un traitement au préalable des plantes avec  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_2^-$  (Siddiqi et al., 1992), il semblerait que le signal soit déclenché par une étape en aval de l'assimilation du nitrate.

Le nitrite ne se substitue pas au nitrate pour l'induction du transporteur. Au contraire, il prolonge le temps de latence et diminue l'absorption des nitrates (Tompkins et al., 1978; Kronzucker et al., 1999a). Selon ces auteurs, une alimentation ammoniacale ne supprime pas les phases de latence et d'induction mais, par contre, inhibe l'influx via l'effet de  $\text{NH}_4^+$  sur les systèmes inductible et constitutif. Un pré-traitement de plantules de Soja avec certains acides aminés, inhibe l'influx (Muller et al., 1995). Vidmar et al. (2000) trouvent chez l'orge que l'influx peut être régulé par  $\text{NH}_4^+$  et la glutamine. Le KCN n'a pas d'effet sur l'influx, tandis que le 2,4 dinitrophénol (inhibiteur du métabolisme) l'inhibe (Aslam et al., 1996b).

Le transport des nitrates est variable en fonction de la concentration en nitrate dans la solution ambiante. Cette variation suggère l'existence de plusieurs mécanismes ou types de transports correspondant à plusieurs cinétiques de saturations. Trois modèles de transports sont évoqués pour expliquer l'absorption (Ibarlucea et al., 1983; Ullrich et Guern, 1990; Siddiqi et al., 1990). Un premier modèle supposant l'existence de deux transporteurs de type

Michaelis-Menten a été proposé par plusieurs chercheurs (Rao et Rains, 1976; Doddema et Telcamp, 1979; Siddiqi et al., 1990; Aslam et al., 1992; Peuke et Kaiser, 1996; Peuke et Jeschke, 1998, 1999) chez *Hordeum vulgare*, *Arabidopsis* et *Beta vulgaris*. De même, chez *Populus tremuloides* et *Pinus contorta* l'influx de  $\text{NO}_3^-$  a été trouvé biphasique et consistant avec des systèmes de transports inductible saturable à haute affinité et constitutif non-saturable à faible affinité (Xiangjia et al., 2000). Tandis que Breteler et Nissen (1982) et Neyra et Hageman (1975) proposèrent un second modèle chez d'autres espèces qui suppose l'existence d'un seul type de transporteur à saturation multiphasique. Cardenas-Navarro et al. (1999) en estimant l'effet de la lumière et de la nutrition nitrique sur l'influx du nitrate par l'accumulation de l'azote chez des plantes de tomates induites trouvent que les cinétiques de l'influx montrent des modèles multiphasiques. La vitesse maximale de l'influx (I) de chaque phase dépend de la lumière et de la concentration de la plante en nitrate ( $[\text{NO}_3^-]_p$ ). La vitesse de l'influx et le I montrent une corrélation négative non linéaire avec  $[\text{NO}_3^-]_p$ . De plus, ces résultats suggèrent l'existence d'une concentration limite ( $[\text{NO}_3^-]_p \sim 66 \text{ mM}$ ) pour laquelle l'influx est nul pour n'importe quelle concentration en nitrate de la solution. Ces auteurs proposent alors un modèle utilisant des cinétiques de Michaelis-Menten modifiées pour prévoir la vitesse de l'influx en fonction des concentrations en  $\text{NO}_3^-$  de la solution et de la plante. Un troisième modèle mixte comparable à celui décrit par le nitrite (Ibarlucea et al., 1983) possédant une composante saturable de type Michaelis-Menten et une composante de diffusion a été également proposé.

Pour s'adapter au changement de concentration en nitrate du sol certaines espèces développent un système multiphasique d'absorption du nitrate hautement régulable (Cardenas-Navarro et al., 1999). En revanche, chez la plupart des espèces l'absorption des nitrates a été reportée être biphasique avec un système de transport à haute affinité (HATS;  $K_m = 5 \text{ à } 300 \text{ }\mu\text{M}$ ) et un système de transport à faible affinité (LATS; cinétique linéaire et un  $K_m > 0.5 \text{ mM}$ , Doddema et Telcamp, 1979; Goyal et Huffaker, 1986; Siddiqi et al., 1990; Glass et al., 1992). Ces deux systèmes emploient un symporteur  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  électrogénique (McClure et al., 1990; Ullrich et Novacky, 1990; Ruiz-Cristin et Briskin, 1991; Glass et al., 1992) et sont sujets à différents modes de régulation (Behl et al., 1988; Siddiqi et al., 1990; Aslam et al., 1992; Glass et al., 1992; Kronzucker et al., 1995). Chez beaucoup d'espèces (Maïs: Hole et al., 1990; Orge: Aslam et al., 1992; Sapin: Kronzucker et al., 1995) le HATS a une composante constitutive (cHATS) et une autre inductible (iHATS) (Glass et Siddiqi, 1995). Au contraire, le LATS a été montré possédant seulement une activité constitutive (Siddiqi et al., 1990; Glass et al., 1992; Kronzucker et al., 1995; Glass et Siddiqi, 1995). Pour

tester ce modèle à trois transporteurs (cHATS, iHATS et cLATS) des études génétiques ont abouti à l'identification et l'isolement d'un gène CHL1 (AtNRT1) chez *Arabidopsis* (Tsay et al., 1993; Huang et al., 1996) responsable de l'absorption du nitrate par un transporteur à faible affinité. Ce gène code pour une protéine hydrophobe avec 12 segments transmembranaires putatifs qui est une topologie trouvée chez plusieurs cotransporteurs (Saier, 1994). Il est inductible par le nitrate et dépend du pH, indiquant qu'il code pour un transporteur électrogénique  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  (Tsay et al., 1993). Du fait que le LATS a été montré possédant une activité constitutive seulement (Siddiqi et al., 1990; Glass et al., 1992; Kronzucker et al., 1995; Glass et Siddiqi, 1995), Huang et al. (1996) pour concilier ces résultats contradictoires postulent l'existence de deux gènes distincts pour le LATS chez *Arabidopsis* (CHL1 pour iLATS et un autre gène pour cLATS) comme a été trouvé chez la tomate (LeNRT1-2 pour iLATS et LeNRT1-1 pour cLATS, Lauter et al., 1996) et chez *Brassica napus* (BnNRT1;2 pour iLATS, Zhou et al., 1998). Trois années plus tard, Huang et al. (1999) mettent en évidence l'existence d'un gène homologue à CHL1, AtNRT1:2, codant pour la composante constitutive du système d'absorption du nitrate à faible-affinité. L'analyse de cinétique d'absorption du nitrate à 10 mM par *Xenopus* ovocytes auquel AtNRT1:2 a été injecté montre un  $K_m$  pour le nitrate de  $\sim 5.9$  mM. Au contraire de CHL1, AtNRT1:2 est constitutivement exprimé avant et après exposition au nitrate. Il est réprimé transitoirement quand le niveau de l'ARNm du CHL1 commence à augmenter significativement. L'ARNm du CHL1 a été trouvé principalement dans les poils absorbants et l'épiderme de l'apex racinaire (jeune partie) et plus loin de l'apex il est trouvé dans le cortex ou l'endoderme des racines (régions matures) (Huang et al., 1999). Ces auteurs concluent que le système d'absorption du nitrate à faible affinité, comme le système à haute affinité, est constitué de composantes inductibles et constitutives et qu'avec leur fonctions distinctes, elles font partie d'un réseau d'absorption du nitrate élaboré chez *Arabidopsis*.

Par ailleurs, Liu et al. (1999) démontrent que CHL1 est aussi impliqué dans la phase inductible et la phase constitutive du HATS chez *Arabidopsis* du fait que des mutants d'*Arabidopsis* en CHL1 connus par leur déficience en LATS sont aussi déficients en iHATS et cHATS. De plus, ces auteurs ont trouvé que chez ces mutants la phase constitutive peut être rétablie par l'expression du cADN du CHL1 conduit par le virus de la mosaïque 35S, par contre, la phase inductible reste déficiente, indiquant qu'elle est en parfaite harmonie avec le niveau constitutif de l'expression du CHL1 chez ces plantes transgéniques. Ces auteurs concluent alors que chez *Arabidopsis* CHL1 est impliqué dans les deux types de transports (HATS et LATS) et qu'une seule protéine transporteur du nitrate peut être responsable de plus

d'un mode distinct de l'activité d'absorption dans les cinétiques observées. Dans une autre étude, le clonage de gènes chez le riz a permis la mise en évidence d'un autre gène, OsNRT1, codant pour le cLATS et présentant plus de propriétés fonctionnelles en commun avec celui trouvé chez *Arabidopsis* (AtNRT1:2 pour cLATS reporté récemment par Huang et al., 1999) qu'avec CHL1 (Lin et al., 2000).

Chez *Arabidopsis thaliana* deux gènes du HATS désignés par Nrt2;1At et Nrt2;2At ont été isolés par Zhuo et al. (1999). Ces auteurs ont trouvé que le nitrate induit ces deux gènes. Le Nrt2;1At, à l'inverse du Nrt2;2At, n'apparaît qu'après 10 jours et devient plus important que le second. L'expression du Nrt2;1At est fortement corrélée avec le iHATS des racines intactes sous plusieurs traitements. L'utilisation d'inhibiteur de l'assimilation de l'azote indique que le  $\text{NH}_4^+$ , la glutamine et d'autres acides aminés interviennent dans la régulation (down-regulation) de l'expression du Nrt2;1At. De même, Vidmar et al. (2000) trouvent que chez l'orge l'expression du gène HvNRT2 codant pour le HATS ainsi que le HATS lui-même peuvent être régulés (down-regulation) par  $\text{NH}_4^+$  et la glutamine. Selon Kronzucker et al. (1999a) une alimentation ammoniacale inhibe l'influx via l'effet de  $\text{NH}_4^+$  sur le iHATS plutôt que sur cHATS ou LATS.

## **II. 2. Système de l'efflux**

La signification et l'importance de l'efflux dans l'acquisition des nitrates par les plantes supérieures ont été démontrées chez plusieurs espèces de plantes par l'utilisation de traceurs stables ou radioactifs:  $^{36}\text{ClO}_3^-$ ,  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{N}$  (Morgan et al., 1973; Breteler et Nissen, 1982; Lee et Clarkson, 1986; Oscarson et al., 1987; Siddiqi et al., 1989, Hole et al., 1990, Muller et al., 1995). On pense que le nitrate est exsudé dans la solution via un ou plusieurs canaux (Miller et Smith, 1996; Clarkson, 1998; Ter Steege et al., 1999). Chez le blé, l'efflux du  $\text{NO}_3^-$  peut se produire nettement dans la solution nutritive ne contenant pas de  $\text{NO}_3^-$  (Minotti et al., 1969; Minotti et Jackson, 1970; Talouizte et al., 1990) alors que la présence de  $\text{NO}_3^-$  et l'influx de  $\text{NO}_3^-$  qui en résulte sont nécessaires pour déclencher l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  chez *Phaseolus vulgaris* (Talouizte et al., 1990). Chez le Soja l'efflux est inversement relié à la concentration externe en  $\text{NO}_3^-$  (MacDuff et al., 1994), par contre, une corrélation positive a été établie entre l'efflux et la concentration interne en  $\text{NO}_3^-$  (Deane-Drummond et Glass, 1983a, Clarkson, 1986; Aslam et al., 1994, 1995). Ces observations montrent l'existence d'une importante variabilité génétique du processus de l'efflux en interaction avec le nitrate et le processus de l'influx et soulignent l'importance de ce phénomène dans l'absorption nette du nitrate.

### **II. 2. 1. Efflux à partir de la vacuole**

Il est bien établi que les plantes alimentées avec le nitrate en excès par rapport à la

demande de la plante ont l'habilité d'accumuler le nitrate essentiellement dans la vacuole (Clarkson, 1986). Le nitrate stocké dans la vacuole peut être disponible pour l'assimilation servant comme réservoir pour soutenir les processus de croissance durant les périodes où l'azote devient limitant (Jackson et Volk, 1981; MacDuff et al., 1989). Ces auteurs suggèrent que la vitesse nette de transport du nitrate de la vacuole au cytoplasme est proportionnelle à la concentration du nitrate vacuolaire et que la remobilisation du nitrate suit une cinétique du premier ordre. Toutefois, il a été suggéré que le nitrate vacuolaire n'est pas rapidement disponible ou n'est pas assez vite remobilisé pour soutenir l'assimilation durant la déficience en azote (Aslam et al., 1976; Rufty et al., 1982; Morgan et al. 1985; Oscarson et Larsson, 1986). En effet, son accessibilité dépend de la vitesse avec laquelle le nitrate peut être transporté à travers le tonoplaste et du mécanisme régulateur de ce transport. Récemment, basés sur des estimations de la concentration du nitrate cytosolique ce mécanisme a été revu par Glass et Siddiqi (1995). La manière par laquelle le nitrate accumulé devient disponible pour l'utilisation n'est pas bien compris et les facteurs affectant la vitesse de remobilisation ne sont pas encore identifiés. Il a été également étudié sur des vacuoles isolées à partir de plantes et même sur des vésicules. Le mécanisme réel de l'efflux du nitrate à partir de la vacuole dépend du gradient électrochimique entre le cytosol et la vacuole. La dissipation du gradient de pH par le nitrate a conduit certains auteurs à suggérer que c'est un antiport nitrate/proton qui est responsable de l'entrée de  $\text{NO}_3^-$  dans la vacuole et un symport qui facilite l'efflux (Blumwald et Pool, 1985; Lew et Spanswick, 1985; Schumaker et Sze, 1987). L'évidence d'une protéine médiateur de la remobilisation des nitrates vacuolaires est suggérée par le travail de Martinoia et al. (1986) du fait que certains inhibiteurs du transport tel que le p-chloromercuribenzène sulfonate (pCMBS) stimule l'efflux des nitrates à partir de vacuoles isolées à partir de cellules foliaires. Ces auteurs ont trouvé aussi un efflux d'anion faible durant la procédure de l'isolement des vacuoles et pouvant devenir considérable après une période d'incubation de 30 min (environ 30 % de la concentration initiale (51.2 mM) du nitrate vacuolaire).

Dans les racines plusieurs processus peuvent influencer la remobilisation et les mécanismes régulateurs de ce processus: la vitesse d'assimilation des nitrates, le transport du xylème, la vitesse de l'efflux du nitrate vers le milieu ambiant et les variations de la concentration du nitrate cytosolique. Van der Leij et al. (1998), en mesurant *in vivo* le gradient électrochimique à travers le tonoplaste au cours de la remobilisation du nitrate vacuolaire stimulée par une carence en azote chez des plantules d'orge, ont trouvé une différence dans la cinétique de remobilisation du nitrate vacuolaire entre les cellules

épidermiques et corticales de la même racine. Ce processus est plus lent dans les cellules corticales et présente une cinétique similaire à celle trouvée dans l'ensemble du tissu racinaire. Cette différence attribuée par ces auteurs à une variation cellulaire dans le transport du nitrate à travers le tonoplaste peut être l'indice de l'existence d'au moins deux types de mécanismes ou transporteurs responsables de l'efflux du nitrate vacuolaire.

Dans une comparaison du potentiel membranaire avec le potentiel d'équilibre du nitrate ( $E_{\text{NO}_3^-}$ ) ces auteurs et d'autres (MacRobbie, 1979; Bentrup et al., 1986; Miller et Smith, 1992) suggèrent que la remobilisation du nitrate vacuolaire peut se faire par un mécanisme passif durant au moins 24 h après l'installation de la carence car le  $E_{\text{NO}_3^-}$  (-37 à -55.4 mV) est toujours plus négatif que le potentiel trans-tonoplastique (-8 à -20 mV) observé au cours de la remobilisation du nitrate vacuolaire des deux types de cellules. A long terme ces auteurs ont trouvé aussi que le gradient électrochimique pour le nitrate à travers le tonoplaste s'altère faiblement durant 24 heures de carence en nitrates à la différence de celui à travers la membrane plasmique, indiquant que le même mécanisme passif est peut être responsable de l'efflux du nitrate vacuolaire durant toute la période de carence (Van der Leij et al., 1998). Par ailleurs, la diminution graduelle de la concentration du nitrate vacuolaire durant la période de carence (24 h) a permis à la concentration du nitrate cytosolique de l'épiderme et du cortex et à l'activité nitrate réductase (NR) racinaire et foliaire de rester constantes durant toute cette période malgré les pertes de nitrate vers le milieu et un important transport xylémique du nitrate (allant de 15 à 32 mM). Par contre, la remobilisation du nitrate vacuolaire ne semble pas supporter l'efflux du nitrate vers l'extérieur ni même le transport xylémique avec la même ampleur à long terme. L'efflux des nitrates s'arrête brutalement et le transport diminue significativement après les 5 premières heures de la carence.

Ces résultats suggèrent qu'en condition de gradient électrochimique favorable à l'efflux du nitrate vacuolaire, l'ouverture de canal dans le tonoplaste permet aux ions nitrates de se déplacer rapidement à travers le tonoplaste pour élever la concentration cytosolique en ions en quelques secondes, comme dans le cas de l'efflux du calcium à partir de la vacuole (Sanders et al., 1990), pour supporter l'assimilation, le transport et l'efflux des nitrates vers le milieu. Cette hypothèse suggère que l'efflux des nitrates vacuolaires est soigneusement régulé, peut-être par des mécanismes tel que la phosphorylation de protéines comme a été montré pour la lente activité du canal de la vacuole chez les cellules d'aleurone de l'orge (Bethke et Jones, 1997). L'efflux du nitrate de la vacuole peut aussi être contrôlé par les activités relatives du système d'absorption (Miller et Smith, 1992) et de l'efflux à partir du cytosol (Van der Leij, et al., 1998).

## II. 2. 2. Efflux à partir du cytoplasme

La nature du système de l'efflux à travers le plasmalemm ainsi que son mécanisme et sa régulation restent encore plus inconnus que ceux de l'influx (Breteler et Nissen, 1982; Lee et Clarkson, 1986; Deane-drummond, 1986; Oscarson et al., 1987; Aslam et al., 1995; Ter Steege et al., 1999). Des lacunes considérables existent encore dans nos connaissances sur le processus de l'efflux du nitrate à partir du cytoplasme. Les cinétiques d'échanges de traceurs ont permis des estimations de la demie-vie du  $\text{NO}_3^-$  cytoplasmique qui est de l'ordre de 4 à 17 min (Deane-Drummond et Glass, 1982; McNaughton et Presland, 1983; Siddiqi et al., 1991; Devienne et al., 1994). L'efflux est généralement considéré comme un processus passif qui s'effectue par simple diffusion selon un gradient de potentiel électrochimique du fait que le  $\text{NO}_3^-$  du pool cytoplasmique est à un potentiel électrochimique plus élevé que celui du milieu environnant (Morgan et al., 1973; Miller et Smith, 1996). Il est moins sensible aux basses températures que ne l'est l'influx de nitrate (Jackson et al., 1976b). Scaife (1989) interprète l'absorption du nitrate selon le principe pump and leak et considère que l'influx est un processus qui permet à la plante d'absorber en permanence le maximum d'ions nitrates disponibles et que l'efflux est un rejet de l'excès du nitrate selon les besoins de la plante. Mais en fait, il semble que les deux composantes de l'absorption soient régulées et utilisent des mécanismes précis, distincts et modulables en fonction du milieu et des besoins de la plante.

L'influx, processus énergétiquement dépendant, serait constant tandis que l'efflux, phénomène passif, serait fonction du gradient de concentration entre la cellule et le milieu. Cependant, certains résultats suggèrent que l'efflux se fait par un canal anionique de la membrane plasmique de protoplastes d'*Armaranthus* (Terry et al., 1991), de *Chara corallina* (via le canal de  $\text{Cl}^-$  qui est deux fois plus perméable au nitrate qu'au chlore, Tyerman et Findlay, 1989) et des cellules de garde (Shmidt et Shroeder, 1994) dont la capacité varie avec la concentration du  $\text{NO}_3^-$  du pool métabolique et du pool de transport, supposant que le surplus de  $\text{NO}_3^-$  endogène peut être drainé via ces canaux. Aslam et al. (1995) et Tyerman et al. (1986b) suggèrent que l'ouverture de ce canal anionique est facilitée par un pH externe faible variable avec les espèces et modulable par le  $\text{Ca}^{2+}$ . L'influence du nitrate exogène sur l'efflux du nitrate endogène varie selon l'espèce. Lorsque la concentration des nitrates endogènes et exogènes augmente l'efflux des nitrates croît (Breteler et Nissen, 1982; MacKown et al., 1981).

Par ailleurs, Deane-Drummond (1984) en étudiant ce processus suggère que ce transport chez *C. corallina* serait plutôt actif contrôlé par le métabolisme et indique que l'efflux peut se produire même lorsque la concentration du  $\text{NO}_3^-$  cytoplasmique est faible. Il



est inhibé par le diéthylboestrol (inhibiteur du métabolisme). Cependant, des études récentes (Van der Leij et al., 1998) montrent en absence de nitrate exogène un arrêt de l'efflux net de nitrate après 5 h malgré que la concentration du nitrate cytosolique et le gradient électrochimique favorisant l'efflux à travers la membrane plasmique sont maintenues constants pendant 24 h de carence nitrique. Ces résultats suggèrent qu'en absence de nitrate exogène la protéine membranaire responsable du processus de l'efflux du nitrate est peut-être inactivée ou dégradée. Dans les deux cas, les observations impliquent qu'il n'y a pas seulement une régulation de l'influx du nitrate au niveau du plasmalemm (Clarkson, 1986) mais aussi une régulation de l'efflux (Deane-Drummond, 1985). Toutefois, chez des plantes de maïs une corrélation entre la concentration du nitrate endogène et l'efflux a été obtenue durant une déficience en azote et des changements parallèles de l'influx ont été aussi mesurés (Teyker et al., 1988). Des arguments en faveur de ces observations ont été postulés par Aslam et al. (1996b), selon lesquels le système de l'efflux serait induit par le nitrate chez l'orge.

L'influence des nitrates exogènes sur l'efflux varie selon les plantes (Talouizte et al., 1989, 1990). L'efflux chez le blé se produit en absence de  $\text{NO}_3^-$  (Morgan et al., 1973; Jackson et al., 1976b; BenDriss Amraoui et al., 2000; BenDriss Amraoui et Talouizte, 2001), alors que la présence de  $\text{NO}_3^-$  et l'influx de  $\text{NO}_3^-$  qui en résulte sont nécessaires pour déclencher l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  chez *Phaseolus vulgaris* (Talouizte et al., 1990). Chez des plantes de Soja l'efflux est inversement relié à  $[\text{NO}_3^-]$  externe (MacDuff et al., 1994). En revanche, l'existence d'une corrélation positive entre  $[\text{NO}_3^-]$  interne et la valeur de l'efflux a été montrée (Deane-Drummond et Glass, 1983a, Clarkson, 1986; Aslam et al., 1994, 1995). Plusieurs auteurs s'accordent que l'efflux contribue à la régulation de l'absorption des nitrates (Pearson et al., 1981; MacKown et al., 1981; Deane-Drummond et Glass, 1983a; Deane-Drummond, 1984, 1985).

Le fait que l'efflux à partir de racines excisées d'orge augmente par addition de glucose et de  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu suggère que l'efflux, au même titre que l'influx, est un processus qui exige la fourniture du substrat ( $\text{NO}_3^-$ ) et de l'énergie (Aslam et al., 1996a). Ces auteurs considèrent que l'efflux est un processus actif contrôlé par le métabolisme comme il a été suggéré par Deane-Drummond (1984) chez *C. carolina*. Cependant, d'autres chercheurs (Abdellaoui et al., 2001) trouvent que la diminution de l'efflux des nitrates par les racines excisées ne peut pas être liée à une diminution de la disponibilité de l'énergie pour les raisons suivantes: (i) l'efflux des nitrates à partir des plantes intactes soumises à l'obscurité est plus élevé que celui des plantes exposées à la lumière (Abdellaoui et al., 1999) et (ii) un apport de glucose (40 mM) comme source d'énergie, directement aux racines excisées, n'entraîne pas

une stimulation de l'efflux du nitrate (Abdellaoui et al., 2001). Ces auteurs suggèrent alors que l'efflux est sous le contrôle de la partie aérienne, non pas via la translocation des photoassimilats issus des feuilles (Rufty et al., 1989), mais via un facteur photosensible provenant de l'apex. Selon ces auteurs, à l'inverse des sucres qui ont un effet inhibiteur sur l'efflux, ce produit serait un stimulateur de l'efflux dont l'effet disparaît après élimination de l'apex. Ces conclusions qui apparaissent donc opposées à celle d'Aslam et al. (1996a) peuvent être dues à des différences dans les conditions de culture et les protocoles expérimentaux ainsi qu'à l'existence d'une importante variabilité génétique du processus de l'efflux (**chapitres 4, 7 et 8**) et suggèrent des études plus poussées dans ce domaine afin de bien identifier le ou les facteur(s) pouvant être responsables du contrôle de l'efflux à l'échelle de la plante entière et communs à toutes les espèces.

Selon Aslam et al. (1996b), l'induction de l'efflux en fonction du temps est comparable à celle de l'absorption nette. Après une exsorption rapide de  $\text{NO}_3^-$  (3 min), correspondant aux nitrates de l'espace libre, et une phase de latence de 30 min, l'efflux augmente rapidement pendant 12 h, puis diminue au delà de 24 h. Kleinhofs et Warner (1990) et Devienne et al. (1994) indiquent qu'en plus de l'espace libre, les nitrates du cytoplasme et de la vacuole constituent deux compartiments distincts alimentant l'efflux: le cytoplasme alimente l'efflux rapidement (temps de demi-vie d'environ 5 min) tandis que la vacuole lentement (temps de demi-vie d'environ 10 h). L'inhibition de l'induction de l'efflux par la 6 méthylpurine, le cycloheximide et le parafluoro alanine montre que l'efflux est un processus qui exige la synthèse d'ARN et de protéines fonctionnelles au même titre que l'influx (Aslam et al., 1996b). Ces auteurs suggèrent que les nitrates endogènes ne sont disponibles pour l'efflux que lorsque ce dernier soit induit. Après induction complète, les inhibiteurs de la synthèse protéique diminuent de 50 à 60 % la vitesse d'absorption des nitrates, suggérant que les protéines du système de transport de l'efflux sont plus stables et possèdent un turn-over plus élevée que l'influx (Aslam et al., 1995, 1996b). Le nitrite induit également le système de l'efflux probablement par le même mécanisme d'induction de l'influx (Aslam et al., 1996b).

L'efflux varie beaucoup en cycle journalier (faible à la lumière et augmente à l'obscurité, Jackson et al., 1976b, Pearson et al., 1981, Talouizte et al., 1990; BenDriss Amraoui et al., 2000). Il est stimulé par  $\text{NH}_4^+$  (Deane-Drummond et Glass, 1983b, Glass et al., 1985, Lee et Drew, 1989; Aslam et al., 1994). Par contre, Kronzucker et al. (1999b) en alimentant des plantules de riz avec  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$  trouvent que l'influx et l'efflux du  $\text{NO}_3^-$  sont tous les deux significativement réprimés par  $\text{NH}_4^+$ , comparées à des plantes alimentées

seulement par du  $\text{NO}_3^-$ . L'influx est diminué de 50% et l'efflux de 40% seulement contribuant ensemble à une diminution de l'absorption nette de 2.2 fois comparée à celle du contrôle.

Le pH acide, les perturbations et l'excision de la racine stimulent l'efflux alors que le pH basique ne l'affecte pas (Aslam et al., 1995, 1996a). Le  $\text{Ca}^{2+}$  annule partiellement l'effet du pH acide sur l'efflux (Aslam et al., 1995). Le KCN stimule l'efflux, tandis que le 2,4 dinitrophénol (inhibiteur du métabolisme) ne l'affecte pas (Aslam et al., 1996b). Les acides aminés n'influencent pas l'efflux (Muller et al., 1995). L'application de basse température racinaire ne réduit pas la valeur de l'efflux. L'ensemble de ces résultats suggère que le site de l'efflux ainsi que son contrôle sont différents et indépendants de ceux de l'influx (voir 3<sup>e</sup> paragraphe de la page 8, Jackson et al., 1976b; Pearson et al., 1981, Deane-Drummond, 1984, Aslam et al., 1994, 1995).

Johannes et al. (1998) ont trouvé chez une algue qu'un faible  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  et  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  élevée activent l'efflux de  $\text{Cl}^-$ , en revanche ils ont observé que l'efflux de  $\text{Cl}^-$  est complètement inhibé par phosphorylation et que la déphosphorylation l'inhibe moins intensivement. En plus, des études électrophysiologiques utilisant des inhibiteurs de protéine kinase indiquent que les canaux anioniques lents (slow anion channels) du plasmalemma des cellules de gardes peuvent être modulés par des processus de phosphorylation et déphosphorylation (Schmidt et al., 1995). Récemment, Frachisse et al. (2000) ont caractérisé un flux anionique chez des cellules de l'hypocotyle d'*Arabidopsis*. Ce flux, activé par dépolarisation de la membrane, a des cinétiques d'activation et désactivation lentes de l'ordre de 10 sec. Il présente plusieurs propriétés distinctes de celles du flux anionique rapide (Rapid-type anion current). Le canal type-lent est beaucoup perméable au nitrate avec un  $\text{P}^-/\text{P}^+$  proche de 20, mais totalement imperméable au sulfate. L'activation du canal requiert de l'ATP cytosolique et le flux lent est partiellement inhibé par la staurosporine, suggérant que la régulation du canal implique une phosphorylation de protéine. Ces canaux (slow and rapid anion channels) sont assumés avoir des fonctions spécifiques: le premier est capable d'intervenir dans le soutien de l'efflux des anions, tandis que le second est un bon candidat pouvant être impliqué dans la transmission des signaux électriques rapides. Ces observations indiquent que l'efflux du nitrate, qui peut utiliser un canal, peut être régulé par phosphorylation et déphosphorylation comme pour le  $\text{Cl}^-$  chez les algues (Johannes et al., 1998), ou même pour le nitrate chez les cellules de garde (Schmidt et al., 1995) et l'hypocotyle (Frachisse et al., 2000). Par contre, au niveau des racines beaucoup d'études restent encore à réaliser s'il on veut généraliser pour toute la plante et compléter les résultats de Tyerman et Findlay (1989), Schmidt et Shroeder (1994) et Aslam et al. (1995, 1996b) car si ces processus de régulation existent aussi au

niveau de ces organes le mécanisme doit être beaucoup plus fonctionnel étant donné les quantités de nitrates que la racine peut effluer au cours d'une période d'obscurité ou en présence de concentration de nitrate élevée dans le milieu racinaire (**chapitres 3 et 4**).

### **III. Régulation de l'absorption des nitrates**

L'absorption de  $\text{NO}_3^-$  est contrôlée par les besoins en azote de la plante et la croissance. Les informations dont on dispose sur la régulation de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par la demande en N des feuilles, ont été obtenues par des études de privation en azote. La suppression de  $\text{NO}_3^-$  plusieurs jours entraîne une augmentation des capacités d'absorption de  $\text{NO}_3^-$  quand les plantes sont ré-alimentées en  $\text{NO}_3^-$ . Ceci est observé chez de nombreuses espèces (Jackson et al., 1976a; MacKown et al., 1981; Lee, 1982; Talouizte et al., 1984b; Chapin et al., 1988; Rodgers et Barneix, 1989). Cette réponse à la carence en N est maximale seulement quelques dizaines d'heures après élimination de  $\text{NO}_3^-$  de la solution, mais elle est transitoire car la privation en  $\text{NO}_3^-$  à plus long terme empêche l'induction des systèmes de transport des nitrates (Touraine et Gojon, 1997). Elle apparaît avant toute modification mesurable sur la croissance (Lee et Rudge, 1986; Touraine et Gojon, 1997) et est également spécifique au  $\text{NO}_3^-$  (Lee et Rudge, 1986; Lee, 1993).

Des études plus détaillées ont montré que la stimulation de la capacité à absorber  $\text{NO}_3^-$  n'est pas exclusivement liée à l'absence totale de  $\text{NO}_3^-$  dans la rhizosphère, mais se manifeste aussi quand  $[\text{NO}_3^-]$  exogène est simplement atténuée (Mattson et al., 1991, Touraine et Gojon, 1997). Ces auteurs concluent alors qu'il s'agit de l'aptitude à modifier rapidement l'efficacité du système d'absorption quand  $[\text{NO}_3^-]$  externe change. Cette efficacité de prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  est d'autant plus forte que le nitrate est peu abondant (Touraine et Gojon, 1997).

Il semble que cette réponse adaptative soit due à des changements dans la nature et l'abondance des systèmes protéiques de transport au niveau de la membrane plasmique. Ces systèmes sont probablement sujets à des processus de répression/dérépression à un niveau encore indéterminé de leur expression (Clarkson et Lüttge, 1991). La spécificité de cette régulation vis-à-vis de N suggère que les signaux qui en sont responsables sont des métabolites azotés ou des composés impliqués en amont ou en aval dans le métabolisme de l'azote.

De ce fait plusieurs facteurs impliqués directement ou indirectement dans l'assimilation de  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , glucides, acides aminés et organiques) aussi bien que le  $\text{NO}_3^-$  lui-même ont été identifiés comme étant des effecteurs de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$ . Il est probable aussi que ces facteurs coopèrent à la régulation comme signaux, et que cette régulation s'exerce sur les transporteurs eux-mêmes et sur leur synthèse. La régulation de

l'expression des gènes du métabolisme de l'azote et des transporteurs du nitrate commence à être éclaircie chez les végétaux inférieurs et supérieurs, toutefois nos connaissances sur les mécanismes précis impliqués dans cette régulation resteront toujours incomplètes et fragmentaires tant que l'identité des transporteurs eux-mêmes et leurs gènes n'auront pas été totalement élucidées.

### **III. 1. Régulation par le nitrate, l'influx et l'efflux**

On a longtemps considéré que l'absorption du nitrate était régulée selon le principe pump and leak proposé par Scaife (1989) consistant à absorber en permanence le maximum d'ions nitrates disponibles et à en rejeter l'excès selon la demande de la plante. Mais en fait, il semble que les deux composantes de l'absorption soient indépendantes et participent toutes les deux dans la régulation de l'absorption du nitrate (Breteler et Nissen, 1982; Deane-Drummond et Glass, 1983a; Lee et Drew, 1986; Clarkson, 1986; Oscarson et al., 1987) car l'absorption nette des nitrates dépend de la valeur du rapport influx et efflux du nitrate (Morgan et al., 1973; Devienne et al., 1994). Toute variation dans l'absorption des  $\text{NO}_3^-$  peut être due à une variation de l'influx ou de l'efflux. L'absorption des ions  $\text{NO}_3^-$  est commandée par l'influx si l'efflux est nul. Si l'influx et l'efflux sont de la même grandeur l'absorption des nitrates devient alors nulle (Talouizte et al., 1990).

Dans la cellule le nitrate absorbé est distribué entre un pool métabolique (cytoplasme) et un pool de réserves (vacuole). La vitesse de pénétration du nitrate dans ces deux pools est différente. Elle est grande dans le premier cas et faible dans le second cas (Clarkson, 1986). Cette différence peut être due à des différences au niveau du système de transport des nitrates au niveau du plasmalemme et du tonoplaste en relation avec la concentration des nitrates du milieu ambiant, du cytoplasme et de la vacuole. Les flux du nitrate à travers le tonoplaste sont régulés par la concentration vacuolaire du nitrate, du  $\text{Cl}^-$  et d'autres anions (Smith, 1973; Cram, 1973, 1983; Glass et Siddiqi, 1985). Quand la concentration en nitrate du milieu extérieur est nulle, la re-mobilisation du nitrate vacuolaire, qui dépend de l'assimilation racinaire, du transport et de l'efflux des nitrates, en contrôlant la concentration du nitrate cytoplasmique permet le maintien du gradient de potentiel électrochimique entre le cytoplasme et le milieu (Van der Leij et al., 1998).

L'existence d'une corrélation entre le nitrate (endogène [cytosolique et vacuolaire] et exogène) et les systèmes d'absorption (influx, efflux, iHATS et iLATS) suggère que le nitrate peut être considéré comme le facteur par lequel s'effectue les premières étapes de la régulation de l'absorption (Morgan et al., 1973; Jackson et al., 1976a; Doddema et Telcamp, 1979; MacKown et al., 1981; Breteler et Nissen, 1982; Deane-Drummond et Glass, 1983a;

Clarkson, 1986; Goyal et Huffaker, 1986; Miller et Smith, 1992; Devienne et al., 1994; MacDuff et al., 1994; Aslam et al., 1994, 1995; Glass et Siddiqi, 1995; Bethke et Jones, 1997; Van der Leij et al., 1998). En effet, quelle que soit sa provenance (interne ou externe) et son site d'action (influx ou efflux), tous ces chercheurs s'accordent sur le fait que le nitrate via son effet sur l'influx et l'efflux contrôle sa propre absorption nette. Toutefois, les observations de Cram (1973), Glass et Siddiqi (1985) et Van der Leij et al. (1998) laissent penser aussi que la compartimentation cellulaire de cet ion et les relations entre cytosol et vacuole dans la racine peuvent être impliquées dans la régulation de l'absorption du nitrate.

Dans certaines conditions (obscurité ou haute concentration du milieu extérieur en nitrate), l'efflux du nitrate du pool cytoplasmique représente une proportion considérable de l'influx (Pearson et al., 1981). L'absorption nette est alors contrôlée par l'importance de l'efflux, l'influx restant relativement constant (Deane-Drummond, 1984, 1985). Une corrélation négative entre l'absorption et les nitrates endogènes existe (Breteler et Nissen, 1982; Glass et al., 1985; Siddiqi et al., 1989, 1990; Lainé et al., 1995; Cárdenas-Navarro et al., 1998, 1999). La concentration de  $\text{NO}_3^-$  dans le cytoplasme exerce un double rétrocontrôle sur l'absorption nette: lorsque  $[\text{NO}_3^-]_{\text{cyt}}$  atteint une valeur critique (nettement supérieur au seuil d'induction), on observe une augmentation de l'efflux, mais aussi une diminution de l'influx. Cette diminution de l'influx de nitrate persiste en présence d'inhibiteurs de la voie d'assimilation de l'ammonium, et s'observe chez des mutants dépourvus de NR (King et al., 1993), ce qui confirme qu'il s'agit d'une rétroinhibition par  $\text{NO}_3^-$  lui-même.

Récemment, pour étudier la régulation du HvNRT2, gène qui code pour le HATS, Vidmar et al. (2000) en traitant séparément des plants alimentés en nitrate avec le tungstate, (inhibiteurs de la NR) trouvent que le tungstate augmente la transcription du HvNRT2 par 20% à 30% et diminue l'influx du  $\text{NO}_3^-$  par 50%, indiquant encore que le  $\text{NO}_3^-$  lui-même ne régule pas l'abondance de la transcription du HvNRT2, mais peut exercer un effet direct sur l'influx (post-transcriptional). En revanche, plusieurs expérimentations montrent que certains produits du métabolisme du nitrate sont aussi inhibiteurs de l'influx de  $\text{NO}_3^-$  (MacKown et al., 1982a; Breteler et Siegerist, 1984; Cooper et Clarkson, 1989; Muller et al., 1995; Lejay et al., 1999; Vidmar et al., 2000).

### **III. 2. Régulation par les produits du métabolisme du nitrate**

La présence de  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu de culture diminue l'absorption du nitrate (Jackson, 1978, Glass, 1988; Lee et Drew, 1989; Warner et Huffaker, 1989; de la Haba 1990; Chaillou et al., 1994). Le fait que l'inhibition de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par l'ammonium est rapide et réversible suggère un effet direct sur les transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  (Lee et Drew, 1989).

Dans d'autre cas, l'effet de  $\text{NH}_4^+$  sur l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  est levé par les inhibiteurs de la glutamine synthétase (GS) et de la glutamate synthase (GOGAT) (Breteler et Siegerist, 1984; Lee et al., 1992). Dans ce cas, l'effet inhibiteur de  $\text{NH}_4^+$  sur l'influx paraît s'effectuer par des acides aminés formés à partir de  $\text{NH}_4^+$  (Muller et Touraine, 1992; Muller et al., 1995). Ce phénomène semble impliquer dans la répression et la dérépression du transport de  $\text{NO}_3^-$  en conditions de satiété et de carence en azote, respectivement. Ces observations confirment l'hypothèse d'une inhibition de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par les produits de l'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  (Rufty et al., 1982). En effet, la répression par  $\text{NH}_4^+$  peut s'effectuer indirectement par (i) inhibition de l'influx par les acides aminés issues de l'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  (Doddema et Otten, 1979; Breteler et Siegerist, 1984; Breteler et Arnozis, 1985; Glass et al., 1985; Lee et Rudge, 1986; Lee et Drew, 1989; Cooper et Clarkson, 1989) ou par (ii) inactivation de la NR (MacKown et al., 1982a, 1982b; Lejay et al., 1999) qui augmente l'efflux des  $\text{NO}_3^-$  endogènes (de la Haba, 1990). Elle peut aussi s'effectuer directement par une rapide stimulation de l'efflux du nitrate (Deane-Drummond et Glass, 1983b; Deane-Drummond, 1985; Lee et Drew, 1989; Clarkson, 1985; Aslam et al., 1994) ou inhibition de l'influx (Muller et al., 1995; Vidmar et al., 2000).

En revanche, Kronzucker et al. (1999b) en alimentant des plantules de riz avec  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$  trouvent que l'influx et l'efflux du  $\text{NO}_3^-$  sont tous les deux significativement réprimés par  $\text{NH}_4^+$ , comparées à des plantes alimentées seulement par du  $\text{NO}_3^-$ . L'influx est diminué de 50%, par contre, l'efflux l'est de 40% seulement permettant ainsi une chute de l'absorption nette de 2.2 fois comparée à celle du contrôle. De même, étant donné que l'efflux du nitrate constitue seulement 8.7% (sur  $\text{NO}_3^-$ ) à 11.4% (sur  $\text{NO}_3^-$  plus  $\text{NH}_4^+$ ) de l'influx, tout effet sur l'efflux aurait une contribution négligeable dans l'absorption nette du nitrate. Ces auteurs concluent que la répression de l'absorption nette du nitrate par l'ammonium se fait principalement sur l'influx, et non par l'accroissement de l'efflux. Cette conclusion supporte celle de Lee et Drew (1989) et Kronzucker et al. (1999a) comparée à celle formulée par Aslam et al. (1997).

Les mécanismes d'action de  $\text{NH}_4^+$  sur l'absorption du  $\text{NO}_3^-$  peuvent être multiples et probablement variables avec les conditions de cultures, le stade de développement, le protocole expérimental et les espèces. Il a été proposé que l'ammonium (i) agit par "feed-back" négatif sur le système de l'influx (Glass, 1988; Lee et Drew, 1989; Lee et al. 1992; King et al., 1993; Ayling, 1993), (ii) inhibe allostériquement l'activité du système de transport (MacKown et al., 1982a, 1982b), (iii) stimule (Deane-Drummond et Glass, 1983b; Kronzucker et al., 1999a) ou inhibe le système de l'efflux du nitrate (Kronzucker et al.,

1999b), (iv) diminue la disponibilité d'ATP et des squelettes carbonés en conséquence de l'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  (MacKown et al., 1982b) et (v) induit l'inhibition de l'absorption du nitrate par augmentation de l'influx de  $\text{NH}_4^+$  qui provoque une dépolarisation de la membrane et donc diminue la force proton motrice nécessaire pour le transport des anions (cotransport  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ , Ullrich et al., 1984).

L'influence des acides aminés endogènes sur l'absorption semble se manifester à travers son effet sur l'efflux seulement selon Deane-Drummond et Glass (1983b) et sur l'influx essentiellement selon Lee et Drew (1986) et Muller et al. (1995). Selon ses derniers auteurs, l'effet des acides aminés sur l'absorption nette des nitrates s'exerce sur l'influx et ne concerne pratiquement pas l'efflux du nitrate. Un apport exogène d'acides aminés au niveau des cotylédons inhibe l'absorption du nitrate (Breteler et Arnozis, 1985; Muller et Touraine, 1992; Muller et al., 1995). Certains acides aminés inhibent l'absorption de nitrate, alors que d'autres sont peu ou pas efficaces. L'arginine, l'alanine et l'asparagine inhibent fortement l'absorption du nitrate, tandis que d'autres tels que, la glutamine, le glutamate, la méthionine et l'aspartate l'inhibent modérément. L'histidine, la leucine, l'isoleucine, la serine, la valine, la phénylalanine et la leucine sont pratiquement sans effet. La signification de cette sensibilité différentielle du transport du nitrate aux différents acides aminés n'est pas comprise (Touraine et Gojon, 1997).

L'inhibition de l'absorption par les acides aminés ne pourrait pas être due à un effet sur les systèmes de transports de la membrane plasmique des cellules racinaires, puisque l'absorption des nitrates n'est affectée qu'après un temps de latence lent (3 à 4 h) et ne se rétablit pas, même si les plantes sont transférées sur solution dépourvue d'acides aminés (Breteler et Arnozis, 1985; Muller et Touraine, 1992; Touraine et al., 1995). Ces observations ont conduit ces chercheurs à suggérer que les acides aminés régulent l'absorption des nitrates au niveau métabolique, plutôt que directement par un effet sur les systèmes de transport des nitrates.

Dans une étude sur l'influence du statut azoté et carboné sur l'expression de deux gènes (Nrt2;1 et Nrt1) du transport de  $\text{NO}_3^-$  chez *Arabidopsis thaliana*, Lejay et al. (1999) montrent que l'expression du Nrt2;1 est stimulée par la carence en nitrate chez des plantes sauvages et par une limitation en azote chez des mutants déficients en NR transférés sur  $\text{NO}_3^-$  comme seule source d'azote. Ces observations montrent que l'expression du Nrt2;1 est sous une répression feedback par des métabolites azotés résultant de la réduction du nitrate. Par contre, l'expression du Nrt1 n'est pas sujette à une telle répression. En effet, le gène Nrt1 est exprimé en excès chez des mutants en NR même sous conditions suffisantes en azote



(croissance en milieu  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), suggérant que l'expression de ce gène est affectée par la présence d'une NR active et non pas par le statut en azote de la plante.

L'influx de  $^{15}\text{NO}_3^-$  est remarquablement augmenté chez les mutants en NR comparés aux plantes sauvages. En revanche, les deux génotypes ont des vitesses d'absorption nette de  $^{15}\text{NO}_3^-$  similaires dues à un efflux de  $^{14}\text{NO}_3^-$  plus important chez les mutants que chez les plantes sauvages. L'expression des deux gènes augmente durant la période de lumière et diminue dans les premières heures de la période obscure, indiquant qu'ils sont régulés par la transition de la lumière à l'obscurité. Un apport de saccharose empêche l'inhibition de l'expression de ces gènes par l'obscurité. Ces auteurs remarquent que, dans toutes les conditions analysées, l'expression du *Nrt2;1* est fortement corrélée avec l'influx du  $^{15}\text{NO}_3^-$  à une concentration externe de 0.2 mM. Au contraire, les changements du taux d'ARNm du *Nrt1* ne sont pas toujours associés avec des changements similaires des activités des systèmes de transport du  $\text{NO}_3^-$  (HATS et LAST) (Lejay et al., 1999).

D'autre part, pour étudier la régulation du *HvNRT2*, gène qui code pour le HATS chez des plantules d'orge, Vidmar et al. (2000) en traitant ces plants avec 10 mM  $\text{NO}_3^-$  en présence ou absence d'acides aminés (aspartate, asparagine, glutamate, glutamine),  $\text{NH}_4^+$  séparément, trouvent que tous les acides aminés diminuent l'influx du  $^{13}\text{NO}_3^-$  par le système à haute affinité ainsi que l'abondance de la transcription du *HvNRT2*, avec une inter-conversion substantielle des acides aminés administrés, ce qui ne leur a pas permis de déterminer l'acide aminé responsable des effets observés. Pour clarifier le rôle individuel de chaque acide aminé, les plants sont traités séparément avec des inhibiteurs de l'assimilation du  $\text{NO}_3^-$  (méthionine sulfoximine et azaserine: inhibiteurs de la GS et la GOGAT, respectivement). Les résultats montrent que le  $\text{NH}_4^+$  et la glutamine (et non le glutamate) exercent à la fois un effet sur l'expression du gène *HvNRT2* et sur le HATS (transcriptional and post-transcriptional down-regulation), mais ils n'excluent pas la contribution d'autres acides aminés.

Chez une suspension de cellules embryonnaires de *Zea mays* Padgett et Leonard (1996) étudient la capacité individuelle des acides aminés à réguler l'induction et l'absorption des nitrates. L'addition de 2 mM de glutamine, glycine, aspartate, ou arginine à la culture avec 1 mM de nitrate inhibe complètement l'absorption du nitrate. Cependant, ni la glutamine ni aucun des 19 acides aminés protéiques testés n'apparaît être le seul responsable de la régulation de l'induction et de l'absorption des nitrates. La capacité des acides aminés à réguler l'absorption et l'assimilation des nitrates apparaît être plus reliée à leur niveau total dans la cellule qu'à l'accumulation d'un acide aminé spécifique. Similairement, l'utilisation d'inhibiteur de l'assimilation de l'azote indique que le  $\text{NH}_4^+$ , la glutamine et d'autres acides

aminés interviennent dans la régulation (down-regulation) de l'expression du gène *Nrt2;1At* codant pour le iHATS dans les racines d'*Arabidopsis* (Zhuo et al., 1999).

Chez des arbres de Hêtre la glutamine et l'aspartate ont été trouvés dans le phloème et inhibent l'absorption nette de  $\text{NO}_3^-$  quand ils sont donnés aux racines (Geßler et al., 1998). Quand ils sont appliqués directement au phloème de l'epicotyle, l'absorption par les racines diminue de 61% par la glutamine et 79% par l'aspartate comparée au contrôle. Une fumigation de la partie aérienne par  $\text{NH}_3$  produit une diminution de 35% de l'absorption nette. Les acides aminés augmentent de 56% et 37% dans la partie aérienne et l'exsudat du phloème, respectivement. Cet enrichissement est dû essentiellement à l'arginine et au glutamate dans les feuilles et à l'aspartate, l'asparagine, le glutamate et la glutamine dans l'exsudat du phloème. La teneur en acides aminés dans les fines racines n'est pas changée par la fumigation, par contre, la teneur de la glutamine augmente significativement. A partir de ces résultats, ces auteurs concluent que le transport phloémien d'acides aminés, particulièrement celui de la glutamine et de l'aspartate intervient dans la régulation de l'absorption nette du nitrate par les racines des arbres de Hêtre dans le but d'adapter ce processus à la demande en azote de la plante entière (Geßler et al., 1998).

Ces observations montrent qu'il existe une hiérarchie dans l'effet des acides aminés, très complexe et variable avec les conditions de cultures, le type de nutrition azotée et les espèces (herbacées et ligneuses), sur les systèmes de transport du nitrate (Breteler et Arnozis, 1985; Muller et Touraine, 1992; Touraine et al., 1995; Padgett et Leonard, 1996; Lejay et al., 1999; Zhuo et al., 1999; Vidmar et al., 2000), en relation avec la distribution de la réduction du nitrate entre les racines et les feuilles et le transport des acides aminés dans la plante (Touraine et al., 1992; Joy et al., 1992; Rochat, 1997). En outre, elles montrent qu'au contraire de ce qu'on peut imaginer, ce sont les acides aminés responsables de la régulation de l'absorption du nitrate peuvent exercer leur effet non seulement sur le HATS mais aussi sur le gène qui code pour ce transporteur. Elles montrent également que plusieurs gènes sont responsables de cette régulation par les acides aminés. Certains, tel que le *Nrt2;1*, sont régulés par les produits de l'assimilation (acides aminés) tandis que d'autres tel que le *Nrt1* sont régulés par une enzyme active de l'assimilation (NR) chez *Arabidopsis thaliana*. Le premier groupe est hautement corrélé avec l'influx tandis que le second groupe ne l'est pas (Lejay et al. 1999).

### **III. 3. Régulation par les acides organiques**

Une étroite relation existe entre le métabolisme du nitrate et du malate (Neyra et Hageman, 1976; Popp et Summons, 1983; Naik et Nicholas, 1986; Chaillou et al., 1986,

Touraine et al., 1992; Wanek et Popp, 2000; Müller et al., 2001). La fixation du carbone dans les racines joue un rôle clé dans l'assimilation de l'azote et la synthèse des acides aminés dans la racine du fait qu'elle alimente ces voies en intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques. Elle maintient aussi l'équilibre de la charge et du pH durant l'absorption et l'assimilation des ions (Davies, 1973; Latzko et Kelly, 1983; Martinoia et Rentsch, 1994). Dans les feuilles, le malate, exporté du chloroplaste par la navette malate-oxaloacétate à la lumière, fournit une source importante de pouvoir réducteur (NADH) utilisé dans la réduction du nitrate en nitrite dans le cytosol. La synthèse du malate contribue à la neutralisation des hydroxyles formés au cours de la réduction du nitrate foliaire (Ben-Zioni et al., 1971; Davies, 1986). Le malate assure la fourniture des chaînes carbonées pour l'assimilation de l'ammoniac dans la mitochondrie. Le malate remplace le nitrate, quant celui-ci est réduit ou absent du milieu, pour maintenir l'équilibre électrique et osmotique de la cellule et de la sève du xylème (Triplett et al., 1980; Siebrecht et Tischner, 1999). Ces observations montrent que le bicarbonate ou le malate peut directement ou indirectement affecter l'absorption des ions nitrates et le métabolisme de l'azote (Cramer et al., 1996; Gao et Lips, 1997; Vuorinen, 1997).

La synthèse du malate réalisée à partir du phosphoenolpyruvate et du bicarbonate est catalysée par la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPcase) et la malate déshydrogénase. La stimulation de l'activité PEPcase par l'élévation du pH a pour conséquence le remplacement d'un acide faible (acide carbonique) par un acide fort (acide malique) ce qui abaisse le pH cytoplasmique (Raven et Smith, 1976). Le malate ainsi formé peut être stocké sous forme de sel (K-malate) dans les vacuoles où il assure l'ajustement osmotique à la place de  $\text{NO}_3^-$ . Il peut également être exporté dans la sève avec les cations d'accompagnements et maintient l'électroneutralité dans la sève (Triplett et al., 1980; Ben-Zioni et al., 1971; Talouizte et al., 1990; Siebrecht et Tischner, 1999). Sa dégradation en pyruvate catalysée par l'enzyme malique est stimulée à pH acide (Davies, 1986). Cependant, en absence de variation de pH l'accumulation d'acides organiques (en cas de non exportation des charges négatives libérées lors de la réduction des  $\text{NO}_3^-$ ) poserait des problèmes d'équilibre ionique et osmotique aux cellules foliaires les obligeant à en exporter une très grande quantité vers les racines (Touraine et al., 1988).

Pour expliquer comment la plante peut réguler l'absorption par les acides organiques provenant de la partie aérienne ou synthétisés dans les racines le modèle de Ben-Zioni et al. (1971) repris par Touraine et al. (1992) propose un contrôle de l'absorption racinaire du  $\text{NO}_3^-$  par la réduction du  $\text{NO}_3^-$  foliaire via la synthèse, la translocation et la décarboxylation du malate et l'exsorption de  $\text{HCO}_3^-$  qui permettrait, par un antiport, l'entrée d'un ion nitrate dans

la cellule. Les données expérimentales disponibles sont en faveur de cette hypothèse. Ainsi chez le soja, le malate stimule l'absorption des  $\text{NO}_3^-$ , qu'il soit fourni directement aux racines ou qu'il soit apporté par la sève phloémique, et la restaure lorsqu'elle est inhibée par un arrêt du transport phloémique (girdling, Touraine et al., 1988). De même, un accroissement du transfert du malate des feuilles vers les racines, par un apport exogène du malate à une partie du système racinaire, stimule l'absorption des  $\text{NO}_3^-$  par la partie du système racinaire non traitée (split-root). Par ailleurs, chez les plantes ligneuses, Wanek et Popp (2000) observent une augmentation non significative de l'absorption nette de  $\text{NO}_3^-$  en réponse à 1 mM de  $\text{HCO}_3^-$ . Par contre, ces auteurs obtiennent un effet positif du  $\text{HCO}_3^-$  sur la réduction du  $\text{NO}_3^-$ . L'effet du  $\text{HCO}_3^-$  sur la translocation et le stockage du  $\text{NO}_3^-$  est variable en fonction de l'espèce. Chez *Populus canescens* (Ait.) Sm. le  $\text{HCO}_3^-$  diminue l'export et le stockage du  $\text{NO}_3^-$ , tandis que chez *Sambucus nigra* L. il augmente l'accumulation du  $\text{NO}_3^-$  dans les racines et diminue sa translocation vers les feuilles.

Ces observations sont en faveur d'une régulation de l'absorption des  $\text{NO}_3^-$  par la partie aérienne (Kirkby et Armstrong, 1980) via les acides organiques formés au niveau de la partie aérienne après réduction du  $\text{NO}_3^-$ . Cependant, le mécanisme exacte par lequel ces acides organiques stimulent l'absorption des  $\text{NO}_3^-$  est encore obscure et très mal connu (Imsande et Touraine, 1994). Il peut s'agir d'un mécanisme qui affecte directement ou indirectement (via la NR et la réduction du nitrate) l'absorption. D'autre part, bien qu'on sait que l'influx de  $\text{NO}_3^-$  est énergétiquement couplé au gradient de pH à travers la membrane plasmique, la nature exacte du système de transport du  $\text{NO}_3^-$  n'est pas connue car on ne sait pas avec exactitude s'il s'agit d'un symport  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ , d'un antiport  $\text{NO}_3^-/\text{OH}^-$  ou d'un antiport  $\text{NO}_3^-/\text{HCO}_3^-$  (libéré par décarboxylation du malate). De ce fait, même si la stimulation de l'absorption du  $\text{NO}_3^-$  par un apport de malate suggère que l'influx dépend de la disponibilité en malate et  $\text{HCO}_3^-$  et du fonctionnement d'un antiport  $\text{NO}_3^-/\text{HCO}_3^-$ , le mécanisme d'action du malate restera obscure tant que nos connaissances sur la structure et la biochimie du transport du  $\text{NO}_3^-$  sont insuffisantes pour trancher en faveur d'un symport ou antiport ( $\text{OH}^-$  ou  $\text{HCO}_3^-$ ). L'hypothèse d'un influx de nitrate couplé à l'efflux de  $\text{HCO}_3^-$  est soutenue par le fait qu'un apport de malate au niveau de la sève phloémique augmente l'absorption du nitrate en même temps que l'efflux de  $\text{CO}_2$  et  $\text{HCO}_3^-$  et l'alcalinisation du milieu (Touraine et al., 1988, Fig. 1).



Par ailleurs, on ne sait pas non plus sur quelle composante de l'absorption les acides organiques agissent principalement: l'influx ou l'efflux et le mécanisme d'action sur ces deux paramètres séparément ou en interaction est pour le moment loin d'être élucidé. Les acides organiques affectent-ils seulement l'activité des transporteurs du  $\text{NO}_3^-$  ou aussi leurs synthèses et l'expression des leurs gènes comme il a été trouvé pour les acides aminés.

### **III. 4. Régulation par les glucides**

L'absorption d'une mole de nitrate consomme 1 à 3 moles d'ATP (Bloom et al., 1992), soit environ 10 à 20% du coût total de l'assimilation de  $\text{NO}_3^-$  dans les racines. Bien que non insignifiant, ce niveau d'utilisation de l'énergie compte pour 5% du catabolisme du carbone racinaire. Des corrélations positives existent entre l'alimentation des racines en sucres et l'absorption de nitrate. L'oscillation de l'absorption du nitrate peut être synchronisée avec l'émergence des feuilles (Vessey et al., 1990). Cette rythmicité de l'absorption du nitrate est supposée résulter des changements de la vitesse de translocation des sucres résultant de la dépendance du développement des nouvelles feuilles en azote (Lim et al., 1990).

L'absorption de  $\text{NO}_3^-$  varie en cycle journalier, augmente régulièrement à la lumière et diminue à l'obscurité (Clement et al., 1978b; Triboi-Blondel, 1979; Hansen, 1980; Pearson et al., 1981; Le Bot et Kirkby, 1992; Scaife et Schloemer, 1994; Delhon et al., 1995a; Andriolo et al., 1996; Cárdenas-Navarro et al., 1998). Ces variations de l'absorption suivent celles de l'intensité lumineuse (Clement et al., 1978b; Delhon et al., 1995a). L'effet stimulateur de la lumière sur l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  s'explique par son effet sur la photosynthèse, la production de glucides et la translocation descendante des glucides des feuilles vers les racines (Fig. 2). L'effet bénéfique des glucides sur l'absorption est confirmé depuis longtemps par l'addition de ces composés directement aux racines (Hänisch-Ten-Cate et Breteler, 1981). L'effet d'un apport exogène de glucides est plus prononcé à l'obscurité qu'à la lumière, ce qui est en faveur de l'idée d'une limitation de l'absorption nocturne par l'approvisionnement des racines en photoassimilats et en énergie (ATP) qui peut provenir de leur oxydation (Bloom et al., 1992). Cependant, ni l'accumulation de glucides solubles, ni la charge énergétique globale de la racine ne sont affectées par le transfert des plants à l'obscurité. Ces faits sont des arguments en faveur d'une forte dépendance de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  du flux et de la composition de la sève élaborée provenant de la partie aérienne.



L'effet de la lumière sur l'absorption a été montré être extrêmement dépendant du transport phloémique. L'arrêt de la conduction phloémique, qui provoque toujours un arrêt rapide de l'absorption, est partiellement annulé par un apport de glucides aux racines. Ces observations suggèrent que l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  exige en permanence une alimentation en glucides des racines via le phloème. Ce rôle joué par les glucides dans le contrôle de l'activité des systèmes de transports de  $\text{NO}_3^-$  est plus important que celui des autres composés de la sève élaborée du fait que l'arrêt de la sève phloémique, qui véhicule aussi les acides aminés foliaires (répresseurs de l'absorption) vers les racines, n'aboutit jamais à une stimulation de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$ . Ceci montre que les glucides sont indispensables au maintien d'une activité de base des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  de la membrane plasmique et contribuent ensemble avec les autres composés de la sève élaborée dans le contrôle de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par les racines qui nécessite l'action de plusieurs molécules (Touraine et Gojon, 1997). De même, il semble que l'activité des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  soit plus sensible au glucose qu'au fructose (Hänisch-Ten-Cate et Breteler, 1981). Cette sensibilité à la nature du composé glucidique, en plus de sa nature de substrat énergétique et fournisseur de squelettes carbonés, a été clairement démontrée pour l'assimilation de  $\text{NO}_3^-$  (Vincentz et al., 1993). Selon ces auteurs le glucose stimule l'expression des gènes de la NR, la nitrite réductase (NiR) et la GS. Toutefois, l'effet du glucose sur les deux composantes de l'absorption reste encore mal connu et controversé. Ce composé stimule l'influx (Touraine et Gojon, 1997) et l'efflux chez l'orge (Aslam et al., 1996a) mais n'affecte pas ce dernier chez le blé (Abdellaoui et al., 2001). L'excision de la racine stimule l'efflux chez l'orge (Aslam et al., 1996a) et le réduit chez le blé (Abdellaoui et al., 2001; **chapitre 7**). Cependant, rien ne confirme encore avec certitude cette variabilité génétique ni même le mécanisme d'action du glucose sur l'activité du HATS, du LATS, du canal de l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  et sur l'expression des gènes de ces transporteurs.

### **III. 5. Régulation par la lumière et le rythme circadien**

Durant la croissance, l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  est principalement déterminée par la production de matière sèche en relation avec l'ontogenèse et les paramètres environnementales (Imsande et Touraine, 1994). Cependant à l'échelle des heures, sous une nutrition constante, la vitesse d'absorption subit des variations continues avec des valeurs élevées durant le jour, et faibles durant la nuit (Clement et al., 1978b; Triboi-Blondel, 1979; Hansen, 1980; Pearson et al., 1981; Le Bot et Kirkby, 1992; Scaife et Schloemer, 1994; Delhon et al., 1995a; Andriolo et al., 1996).

Certaines études montrent une stimulation de l'absorption des nitrates par la lumière chez les plantes supérieures (Pearson et Steer, 1977; Aslam et al., 1979; Rufty et al., 1989; Le



Bot et Kirkby, 1992; Casadesus et al., 1995; Delhon et al., 1995a). Cependant d'autres travaux montrent que l'absorption des nitrates n'est pas modifiée et augmente même à l'obscurité (Hansen, 1980; Rufty et al., 1984; MacDuff et Wild, 1988) ou reste relativement élevée (Matt et al., 2001) ou positive la nuit (Cárdenas-Navarro et al., 1998). Ce désaccord est dû probablement à l'utilisation d'un matériel végétal différent ou à des conditions expérimentales différentes qui impliquent d'autres facteurs physiologiques susceptibles d'influencer l'absorption. Ces variations sont la preuve d'une dépendance de l'absorption vis-à-vis de la lumière qui reste encore très mal connue.

Delhon et al. (1995a) suggèrent que la diminution de l'absorption des nitrates à l'obscurité pourrait être due à une inhibition de l'influx par le  $\text{NO}_3^-$  ou par l'azote réduit accumulé dans les racines à la suite d'une diminution de leur transfert vers les feuilles due à une diminution de la transpiration. D'autres travaux de ces auteurs (Delhon et al., 1995b) montrent que le maintien d'une transpiration constante ne supprime pas l'inhibition de l'absorption nette des nitrates à l'obscurité bien qu'il diminue l'accumulation de  $\text{NO}_3^-$  et de l'azote réduit au niveau des racines. Ces auteurs concluent que l'effet de la lumière sur l'absorption des nitrates ne peut donc être lié à un changement dans l'accumulation et la translocation des composés azotés des racines vers la partie aérienne, mais plutôt au transport phloémique de substances provenant de la partie aérienne tel que le malate ou le saccharose qui pourraient être des effecteurs du système d'absorption des nitrates (Jackson et al., 1986a, 1986b; Delhon et al., 1995b). Par ailleurs, le fait que le maintien de la transpiration permet une diminution des nitrates et de l'azote réduit racinaire laisse supposer que cette diminution de l'absorption par l'obscurité peut être aussi due à une augmentation non négligeable de l'efflux par diminution de la transpiration en parallèle à une diminution de l'influx en condition normale à l'obscurité (**chapitre 4**).

En effet, des études montrent que l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  varie en cycle journalier, faible au début de la période d'éclairement et augmente régulièrement au cours de la période d'obscurité (Jackson et al., 1976b; Pearson et Steer, 1977; Pearson et al., 1981). De plus, dans des études récentes (Schulze et al., 1994; Polley et al., 1995, 1999) des liens étroits ont été trouvés entre la transpiration et l'azote de la plante. Ces liaisons sont encore plus forte entre la transpiration et l'azote des feuilles (Schulze et al., 1994) et probablement même entre la transpiration et l'azote de la sève xylémique et l'azote de la solution nutritive (Barthes et al., 1996).

Récemment, il a été montré qu'une diminution de la conductivité hydraulique racinaire, pouvant induire une réduction de la conductance stomatique, peut être provoquée

par réduction de l'activité des canaux de transport de l'eau ou de leur densité dans la membrane plasmique des cellules racinaires sous l'effet d'une carence en azote (Clarkson et al., 2000). Une ré-alimentation en azote élimine cette diminution de la conductivité hydraulique des racines après 4 à 24 h. Le moyen par lequel l'interception de la carence nitrique par les racines est convertie en réponse hydraulique au niveau des racines et au niveau des stomates n'est pas bien connue (Clarkson et al., 2000).

Ce signal peut être une augmentation de la concentration de l'acide abscisique (ABA) dans la sève xylémique dans le cas d'un stress hydrique (Davies et Zhang, 1991) ou nitrique (Clarkson et Touraine, 1994). En effet, la carence en  $\text{NO}_3^-$  provoque une augmentation de la synthèse d'ABA, ou de son transport xylémique des racines vers les parties aériennes et une diminution de la synthèse des cytokinines (Clarkson et Touraine, 1994). Cette variation du rapport  $[\text{ABA}]/[\text{cytokinines}]$  dans la sève xylémique est corrélée avec une diminution marquée de la transpiration et de la conductivité hydraulique des racines (Radin et Matthews, 1989). Un effet de l'ABA a été également montré par Fiscus (1981) sur la conductivité hydraulique des racines et le transport total des ions à travers le système racinaire de *Phaseolus*. De même, Barthes et al. (1996) ont établi une étroite liaison entre les flux d'eau et la présence du nitrate dans le milieu.

Brewitz et al. (1996) en étudiant la réponse de l'assimilation du nitrate et la translocation de l'azote à une réduction de l'humidité relative (2 à 4%) pendant 6 h trouvent que la vitesse de transpiration augmente beaucoup et la teneur en eau de la partie aérienne diminue de presque 20%, tandis que la teneur en eau des racines n'est pas affectée. L'activité NR des parties aériennes diminue par phosphorylation de l'enzyme durant le stress. Ces auteurs observent aussi une inhibition substantielle de l'absorption du  $\text{NO}_3^-$ , mais la proportion de  $^{15}\text{NO}_3^-$  transportée vers les feuilles est seulement légèrement affectée. Chez les plantes du contrôle, 71% du  $^{15}\text{N}$  retrouvé dans les racines provient de l'azoté re-transporté à partir des parties aériennes, par contre, chez les plantes stressées la re-translocation du  $^{15}\text{N}$  des feuilles vers les racines apparaît complètement inhibée. Ces résultats montrent qu'une réduction de l'humidité de l'air a des effets significatifs sur l'absorption du nitrate et la re-translocation de N. Quelques un de ces effets apparaissent aussi chez des plantes sujettes à une réduction du potentiel hydrique dans la rhizosphère et laissent supposer la possibilité que les relations hydriques des parties aériennes ont une forte influence sur l'absorption et la translocation de l'azote. Similairement, Cárdenas-Navarro et al. (1998), dans une étude de simulation des variations de l'absorption en fonction de celle de l'eau au cours d'un cycle jour/nuit, concluent que l'absorption du nitrate peut être conduite seulement par

l'accumulation de la plante en eau et peut ne pas être seulement sous le contrôle du métabolisme de l'azote. L'ensemble de ces observations constitue un faisceau d'arguments en faveur de l'existence d'une relation entre l'absorption du nitrate et de l'eau contrôlée par la partie aérienne et les hormones.

Le signal envoyé par les racines vers les feuilles en cas de carence nitrique peut être aussi un changement chimique tel qu'une augmentation du pH de la sève du xylème et/ou de l'apoplasme qui provoque une fermeture des stomates (Wilkinson et Davies, 1997). Contrairement à cela, il a été démontré qu'une augmentation du pH du milieu augmente l'ouverture des stomates d'un tissu isolé de l'épiderme de feuilles préalablement bien hydratées (Wilkinson et Davies, 1997). En fait, étant donné que les conditions qui affectent le pH du xylème/apoplaste peuvent affecter aussi la transpiration (l'intensité lumineuse [Cowan et al., 1982; Hoffmann et Kosegarten, 1995], la déshydratation du sol [Hartung et Radin, 1989; Davies et Zhang, 1991; Wilkinson et Davies, 1997], l'alimentation en nitrate [Clarkson et Touraine, 1994] et l'inondation du sol [Else, 1996]), la possibilité que le changement de pH qu'elles peuvent induire pourrait être un moyen par lequel l'ouverture des stomates s'altère existe.

L'implication de ces deux types de signaux dans la régulation de la transpiration a été montrée et élucidée par Wilkinson et Davies (1997). Selon ces auteurs la capacité des cellules du mésophylle et de l'épiderme des feuilles de plantes bien hydratées à séquestrer l'ABA de l'apoplaste est fortement réduite par l'augmentation du pH de l'apoplaste quand celui-ci est augmenté par la sève xylémique qui arrive à son niveau. Dans une étude comparative de ces effets directs et indirects du pH sur la transpiration, ces auteurs montrent que l'ABA non seulement sert de médiateur dans la fermeture des stomates par le pH élevé de la sève xylémique mais est aussi nécessaire pour empêcher une ouverture des stomates au pH élevé de la sève xylémique et une dangereuse perte excessive d'eau (Wilkinson et al., 1998). De ce fait, une diminution de la transpiration à l'obscurité, pouvant être due à une diminution de la conductivité hydraulique des racines et/ou à une fermeture des stomates par élévation du pH de l'apoplaste des feuilles et de [ABA] au niveau de la surface externe des cellules de garde, peut engendrer une accumulation temporaire des nitrates dans les racines par diminution des flux de sève augmentant ainsi la proportion de l'efflux par rapport à l'influx. Il est important de noter que cet effet de la transpiration sur l'absorption est accompagné aussi par l'effet de la diminution de l'activité NR sur l'absorption à l'obscurité (Le Bot et Kirkby, 1992; Delhon et al., 1995a; Scaife and Schloemer, 1994). Cependant, la contribution de chacun de ces deux processus séparément ou en interaction sur l'absorption est très mal connue (**chapitre 4**). De

même on ne connaît pas si leurs effets s'exercent principalement sur l'influx ou sur l'efflux (BenDriss Amraoui et al., 2000).

L'implication de l'influx et de l'efflux dans ces variations de l'absorption est aussi obscure (MacDuff et Jackson, 1992). Lorsque l'absorption des nitrates diminue à l'obscurité on ne sait pas avec précision si ce fait est dû à une diminution de l'influx (MacDuff et Jackson, 1992; Delhon et al., 1995a) et/ou à une augmentation de l'efflux (Pearson et al., 1981) et/ou à une interaction des deux processus. En effet, cette diminution de l'absorption des nitrates à l'obscurité peut résulter (i) d'une diminution de l'influx par inhibition du métabolisme énergétique au niveau des racines due à une faible translocation des photosynthétats à partir de la partie aérienne (Pearson et Steer, 1977; Hansen, 1980) ou (ii) d'une diminution de la réduction des nitrates et de la translocation de l'azote (MacDuff et Wild, 1988, Scaife, 1989) associée à une augmentation de l'efflux des  $\text{NO}_3^-$  non réduit (Scaife, 1989), ou (iii) des deux à la fois. La concentration des sucres solubles des racines augmente par une carence en azote et diminue subséquemment quand une ré-alimentation en azote est restaurée (Talouizte et al., 1984a). Similairement, une diminution de l'absorption des nitrates et du niveau du saccharose a été reportée durant une période prolongée d'obscurité (Rufty et al., 1989). Des études de MacDuff et Wild (1988), Scaife (1988) et Scaife et Schloemer (1994) suggèrent que la lumière pourrait contrôler l'absorption des nitrates par des modifications de l'utilisation de l'azote au niveau de la plante entière. Une sévère défoliation ou excision de la partie aérienne apparaît provoquer une rapide et importante diminution de l'absorption des nitrates comparée avec une exposition à l'obscurité (Minotti et Jackson, 1970; Clement et al., 1978b; MacDuff et al., 1989). Dans la plupart des cas, ces traitements sont supposés affecter (i) la demande en azote associée à l'activité photosynthétique et la croissance et (ii) l'alimentation des racines par les glucides (MacDuff et Jackson, 1992).

Les variations journalières du prélèvement net de  $\text{NO}_3^-$  suivent celles de l'intensité lumineuse (Clement et al., 1978b; Delhon et al., 1995a). L'effet stimulateur de la lumière est dû à la photosynthèse (Fig. 2). Lorsque cette dernière est empêchée par la diminution de la teneur en  $\text{CO}_2$  de l'atmosphère à 10 ppm, la vitesse d'absorption de  $\text{NO}_3^-$  n'augmente pas après l'illumination des plantes, mais est au contraire fortement pénalisée.

L'élimination du  $\text{CO}_2$  de l'atmosphère ou l'incision de la tige (girdling) empêchent d'une façon similaire la stimulation de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  quand les plantes sont transférées de l'obscurité à la lumière. L'effet de ces deux traitements peut être annulé par une re-alimentation en  $\text{CO}_2$  ou par addition de 10 mM de glucose. Le glucose est plus effectif en stimulant l'absorption du nitrate à l'obscurité qu'à la lumière chez des plantes intactes

(Delhon et al., 1996b). Collectivement, ces observations sont interprétées par ces auteurs comme la preuve que les variations diurnes de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  sont dues à une diminution du transport phloémien de photosynthéats à l'obscurité. Similairement, la magnitude de ces changements a été trouvée très dépendante de l'accumulation de l'amidon dans les feuilles à la fin de la photopériode. L'ombrage des plantes diminue cette accumulation, et provoque une amplification des changements diurnes de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$ .

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle la plasticité du rapport jour/nuit de l'absorption du nitrate dans la dépendance au carbone est un important trait de la coordination de l'acquisition de l'azote et du carbone par la plante (Delhon et al., 1996b). Ils suggèrent aussi que les glucides et leur translocation jouent un rôle important dans ces variations diurnes de l'absorption chez le soja. Ils sont en faveur d'une puissante implication de la partie aérienne dans le contrôle de l'absorption des nitrates par les glucides issues de la photosynthèse (Talouizte et al., 1984a, 1984b).

En fait, cet effet clairement relié à l'interception de la lumière est basé sur des mécanismes encore mal connus. Dans un cycle diurne, l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  et la transpiration sont indépendantes (Le Bot et Kirkby, 1992; Delhon et al., 1995b; Andriolo et al., 1996), mais à une large échelle il a été montré qu'elles sont corrélées (Cárdenas-Navarro et al., 1998). Comme l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  est corrélée aussi avec l'assimilation de  $\text{CO}_2$  (Clement et al., 1978a, 1978b), un contrôle indirecte par photosynthèse a été suggéré (Wild et al., 1987). Le flux de composés carbonés à partir de la partie aérienne pourrait réguler l'absorption de  $\text{NO}_3^-$ , qui est un processus ATP-dépendant, à travers la respiration (Glass, 1989). En effet, la respiration racinaire diurne semble étroitement relier à la vitesse d'absorption du  $\text{NO}_3^-$  (Hansen, 1980). Cependant, les résultats de Ourry et al. (1996) sur *Lolium perenne* contredisent l'hypothèse de la limitation de l'absorption du nitrate à l'obscurité par l'alimentation en glucides du fait qu'ils montrent une translocation continue de carbone vers les racines à l'obscurité malgré une diminution de l'absorption, mais sont compatibles avec une régulation par la force d'appel pour l'azote (sink-strength). Cette hypothèse du contrôle de l'absorption par le carbone est encore sous discussion du fait qu'elle est soupçonnée se produire à travers plusieurs mécanismes spécifiques (Glass, 1989; Imsande et Touraine, 1994).

Les variations journalières de l'absorption des nitrates dues à une variation diurne de la réduction du nitrate sont en relation avec les variations de l'expression, la synthèse et de l'activité de la protéine NR qui est supposée suivre un rythme circadien (Deng et al., 1990,

1991). Il en résulterait, une accumulation transitoire de nitrate en période nocturne, qui en retour augmenterait la valeur de l'efflux et diminue donc l'absorption nette des nitrates. D'une façon similaire, Abdellaoui et al. (1999) ont trouvé que la lumière, en stimulant la réduction des nitrates, contribue à une augmentation substantielle de l'absorption des ions nitriques, par le biais d'une diminution de l'exsorption de ces ions hors de la cellule racinaire. Du fait que l'assimilation est en partie un processus photosynthétique dépendant du climat chez plusieurs plantes, l'absorption du nitrate, qui dépend de la nutrition au niveau racinaire, peut être aussi reliée au climat grâce à l'assimilation (Ferrario-Méry et al., 1997). Cette observation est en faveur d'une régulation de l'absorption par le climat via la NR.

Dans les feuilles de tabac, Matt et al. (2001) trouvent que la transcription de la NR diminue durant le jour et se rétablit le soir, et l'activité NR augmente trois fois durant la première partie de la période claire et diminue durant la seconde partie de cette période. Le nitrate diminue durant le jour et se rétablit le soir. L'ammonium, la glutamine, la glycine et la serine augmentent durant le jour et diminuent le soir. Le 2-oxoglutarate augmente trois fois après illumination et diminue durant la dernière partie de la période claire. La transcription de la GS est faible à la fin de la nuit et augmente durant le jour et l'activité de la GS atteint le maximum à la fin du jour et diminue le soir. Dans les racines, le niveau de transcription du transporteur de  $\text{NO}_3^-$  augmente le jour et diminue la nuit (Matt et al., 2001). L'absorption du nitrate est environ 40% plus élevée durant le jour que la nuit.

Durant la première partie de la période claire, la vitesse d'assimilation des feuilles est environ deux fois plus élevée que la vitesse d'absorption et dépasse aussi la vitesse de métabolisation de l'azote réduit, qui résulte de l'assimilation, par la voie GOGAT (Matt et al., 2001). Il en résulte dans les feuilles une diminution du nitrate et une accumulation des intermédiaires azotés du métabolisme de l'ammonium d'environ 40 et 15% du nitrate total absorbé pendant 24 h, respectivement. Plus tard dans la période claire, comme l'expression de la NR et l'activité NR chutent, ce déséquilibre est inversé. L'expression du transporteur de  $\text{NO}_3^-$  et l'absorption du nitrate restent relativement élevées, et le nitrate absorbé durant la nuit est utilisé pour remplir le pool de nitrate foliaire. L'augmentation de l'expression de la GS foliaire durant la seconde partie de la période claire permet la continuation de l'assimilation de l'ammonium issue de la photorespiration et de la remobilisation de l'azote réduit qui avait été accumulé durant la période claire précédente. Ces résultats confirment ceux trouvés par Deng et al. (1991) (Fig. 3) quant à l'effet de la glutamine sur l'expression de la NR.



Ils montrent en plus que la cause majeure et immédiate des changements diurnes du métabolisme de l'azote dans les feuilles est le déséquilibre entre la vitesse de réduction et la vitesse d'absorption du nitrate et le métabolisme de l'ammonium durant la première partie de la période d'éclairement. Ils soulignent aussi l'influence de la lumière (via la NR) sur le pool de nitrate endogène qui en variant au cours d'un cycle jour/nuit peut affecter l'absorption du nitrate (via l'efflux la nuit et l'influx le jour) comme a été observé par Lejay et al. (1999) chez des mutants en NR comparés aux plantes sauvages. Cependant, le mécanisme exacte par lequel la lumière via la NR, la GS, la GOGAT et la métabolisation de l'azote réduit agit sur l'expression du transporteur de  $\text{NO}_3^-$  reste toujours mal connu.

Comme l'assimilation du nitrate est principalement un processus photosynthétique chez les plantes non ligneuses, d'autres hypothèses basées sur un contrôle de l'absorption du  $\text{NO}_3^-$  par quelques produits de l'assimilation, ou par la teneur de la plante en nitrate elle-même ont été formulées. Une application des acides aminés ou du malate, produits de l'assimilation du  $\text{NO}_3^-$  (Ben-Zioni et al., 1971; Touraine et al., 1988), abaisse et stimule l'absorption du  $\text{NO}_3^-$ , respectivement (Lee et al., 1992; Muller et Touraine, 1992; Touraine et al., 1992). Cependant, durant un cycle diurne, ou suivant des traitements nutritionnels, les données bibliographiques concernant la corrélation entre les acides aminés racinaires et l'absorption du  $\text{NO}_3^-$  sont contradictoires (Delhon et al., 1995a, 1995b; Lainé et al., 1995), et la production du malate n'est pas spécifique au métabolisme de l'azote et ne semble pas impliquer dans les variations diurnes de l'absorption chez le soja (Delhon et al., 1996a).

Selon le modèle de Dijkshoorn-Ben Zioni, l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par les racines est stimulée par l'assimilation de  $\text{NO}_3^-$  dans la partie aérienne, à travers le transport phloémien descendant du malate synthétisé en réponse à la réduction de  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NH}_3$  (Delhon et al., 1996a). Une des hypothèses résultant de ce modèle est que les variations diurnes de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  sont dues à la dépendance de la réduction de  $\text{NO}_3^-$  des feuilles vis à vis de la lumière. Chez des feuilles détachées la réduction du  $\text{NO}_3^-$  préalablement stocké ou apporté via le xylème ( $^{15}\text{NO}_3^-$ ) est généralement diminuée à l'obscurité de 50 à 60% par rapport à celle mesurée à la lumière (Delhon et al., 1996a). A l'obscurité un apport de glucose à ces feuilles détachées stimule la réduction de  $\text{NO}_3^-$ , mais pas assez pour l'augmenter plus que le niveau de réduction à la lumière. La réduction de  $\text{NO}_2^-$  dans les feuilles détachées est moins affectée à l'obscurité, et peut être maintenue à un niveau élevé par un apport exogène de substrat. Les feuilles attachées maintiennent aussi leur réduction de nitrite à l'obscurité au même niveau qu'à la lumière par livraison de  $\text{NO}_2^-$  aux feuilles via le xylème (Delhon et al., 1996a). Bien que ceci est assumé restaurer le niveau de la synthèse du malate associée à la



réduction du nitrite à la lumière, il cause une inhibition prononcée de l'absorption du nitrate. De plus, un apport direct du malate à la partie aérienne ou aux racines n'arrive pas à empêcher la diminution de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  à l'obscurité. Les auteurs de ce travail concluent alors que les mécanismes évoqués dans le modèle de Dijkshoorn-Ben Zioni ne jouent pas un rôle important dans les variations diurnes de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  chez les plantes de soja. Ces résultats montrent que le malate est probablement peu ou pas impliqué dans la régulation de l'absorption du nitrate durant le passage de la lumière à l'obscurité ou n'est pas le facteur le plus déterminant à court terme dans la régulation de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  chez le soja.

L'hypothèse impliquant les acides aminés et organiques dans les changements diurnes de l'absorption ne peut pas être rejetée, bien que son utilisation sous forme de modèle prédictif compte encore sur des paramètres qui ne sont pas actuellement disponibles.

Une autre hypothèse simple et plus générale pour expliquer la régulation de l'absorption des ions est basée sur un contrôle via un feedback négatif par la teneur interne en ion, comme proposé pour le potassium (Siddiqi et Glass, 1982, 1986), le chlore (Cram, 1983) et le nitrate (Scaife, 1989; Buysse et al., 1996; Cárdenas-Navarro et al., 1998). Ces modèles comptent sur les corrélations négatives observées entre la vitesse d'absorption et la concentration interne de la plante en ion. Cárdenas-Navarro et al. (1998) chez la tomate observent que sous des conditions nutritionnelles non limitatives et constantes, la vitesse d'absorption nette est contrôlée par un feedback négatif par la teneur interne de la plante en nitrate. Ils ont remarqué aussi que durant un cycle diurne, l'absorption augmente à la lumière et diminue à l'obscurité et que le métabolisme de l'azote se produit seulement durant la période d'éclairement. Par contre, quand l'obscurité est prolongée (28 h, absence de croissance), la vitesse d'absorption diminue mais reste positive. Ce maintien de la vitesse d'absorption à un niveau significativement positif malgré que l'assimilation du nitrate a cessé après 24 h d'obscurité suggère que sous ces conditions l'absorption du nitrate n'est pas sous le contrôle du métabolisme de l'azote. Ces auteurs en comparant l'absorption du nitrate de plants à teneurs en eau variables avec celle de plants à teneurs en eau constantes montrent que les variations de la teneur en eau de la plante diminuent les variations de l'absorption et de la concentration en nitrate de la plante durant un cycle normale de 24 h et soutiennent l'absorption du nitrate même quand la croissance est arrêtée en condition d'obscurité prolongée. A la lumière, ils trouvent que la teneur en eau diminue tandis qu'elle augmente continuellement en période d'obscurité normale et prolongée. Ils expliquent alors le maintien de l'absorption positive par l'augmentation continue de la teneur en eau des plants en période d'obscurité prolongée et concluent qu'en plus du rôle joué par l'assimilation du nitrate et la

photosynthèse en période d'éclairement les variations diurnes de la teneur en eau de la plante contribuent aussi dans les variations diurnes de l'absorption du nitrate. Ces résultats sont en accord avec ceux de Matt et al. (2001). Ils ont trouvé que l'expression du transporteur de  $\text{NO}_3^-$  et l'absorption du nitrate restent relativement élevées durant la nuit et le nitrate absorbé pendant cette période est utilisé pour remplir le pool de nitrate foliaire même si l'expression de la NR et l'activité NR chutent à la fin du jour (voir même la nuit pour l'activité NR).

Par ailleurs, le fait que la teneur en eau de la plante évolue dans le même sens que la concentration en nitrate de la plante et dans un sens opposé à celui de l'absorption du nitrate suggère l'existence d'une corrélation entre les processus d'absorption-assimilation du nitrate et d'absorption-transpiration de l'eau.

### **III. 6. Régulation par les différents organes de la plante**

#### **III. 6. 1. La partie racinaire**

Plusieurs études ont montré que la disponibilité en nitrate affecte le développement du système racinaire (Oparka et al., 1987; Améziane et al., 1994, 1995, 1997; Limami et Améziane, 1997; Zhang et Forde, 2000). D'un autre côté, Pitman (1988) reporte que la vitesse d'absorption des nitrates est étroitement corrélée à la vitesse de croissance de la plante. Cette absorption dépend aussi de l'architecture, du type, ainsi que de l'anatomie des racines et de la distribution spatiale des systèmes de transport le long du système racinaire (Koncalova, 1990; Lazof et al., 1992; Siebrecht et al., 1995; Colmer et Bloom, 1998). Ces résultats montrent l'existence d'une étroite relation entre le nitrate et la croissance racinaire. Dans ce paragraphe je ne parlerais que de l'effet de la croissance racinaire sur le prélèvement de  $\text{NO}_3^-$ , par contre, l'effet du nitrate sur l'assimilation du carbone, la distribution des photoassimilats entre les organes aériens et les organes souterrains et la croissance des racines a été brièvement étudié dans le cadre de l'effet de  $\text{NO}_3^-$  sur l'efflux des sucres (**chapitre 6**). La description des différents niveaux où le  $\text{NO}_3^-$  exerce un effet sur les sucres a été amplement étudiée par plusieurs auteurs. Les travaux de l'équipe de Champigny (Champigny et al., 1984; Talouizte et al., 1984a; Van Quy et al., 1991; Champigny et al., 1991; Van Quy et Champigny, 1992; Champigny et Foyer, 1992; Champigny, 1995) illustrent très bien le mécanisme d'action du  $\text{NO}_3^-$  sur le métabolisme des sucres dans les feuilles tandis que ceux de l'équipe de Morot-Gaudry (Améziane et al., 1994, 1995, 1997; Limami et Améziane, 1997) démontent cette action du nitrate même au niveau des racines. Ces travaux ont apporté beaucoup d'informations dans ce domaine et peuvent servir de base pour des études visant à améliorer encore plus nos connaissances, à l'échelle biochimique et moléculaire, sur l'effet du nitrate sur le métabolisme de la plante.

La compréhension des facteurs déterminants du lessivage du nitrate peut améliorer l'efficacité d'absorption du nitrate et réduire la contamination des eaux souterraines (Bowman et al., 1998). Des expériences avec lysimètre montrent un effet de l'architecture des racines sur le lessivage du  $\text{NO}_3^-$  à partir de deux géotypes d'*Agrostis palustris* différents dans les caractéristiques de l'enracinement. Les concentrations en  $\text{NO}_3^-$  et l'azote total lessivés à partir du géotype à racines peu profondes (38% de l'azote appliqué) sont approximativement deux fois ceux à partir du géotype à racines profondes (18%). Le géotype à racines peu profondes montre une vitesse d'absorption, exprimée à base de la masse des racines, significativement plus élevée que celle du géotype à racines profondes pour les deux formes d'azote ( $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$ ). Collectivement ces données indiquent que les plants à racines profondes absorbent N plus efficacement que les plants à racines peu profondes, réduisant la concentration et la quantité total de  $\text{NO}_3^-$  lessivé. L'effet n'est apparemment pas dû à des différences en absorption d'azote, mais plutôt au modèle d'enracinement. Ces auteurs concluent alors que les conditions environnementales et les pratiques culturales qui affectent l'enracinement en profondeur et la densité peuvent donc affecter la nutrition azotée et le lessivage du  $\text{NO}_3^-$ .

A 1 mm de l'apex l'absorption de l'ammonium est plus rapide que celle du nitrate chez le maïs et le riz (Colmer et Bloom, 1998). Chez le riz l'absorption nette de l'ammonium diminue au delà de 1 mm de l'apex, par contre, l'absorption nette du nitrate augmente au maximum à 21 mm de l'apex et diminue aussi plus loin. L'examen comparatif des résultats obtenues par ces auteurs quand la solution contient  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$  ou contient un seul à la fois montre que chez le riz cette inhibition par ammonium se fait essentiellement entre 1 et 21 mm à partir de l'apex et diminue progressivement au fur et à mesure que l'on s'éloigne de cette zone.

Par contre, chez le maïs l'absorption nette de l'ammonium et du nitrate dans les régions éloignées de l'apex est semblable à celle à côté de l'apex. Ces auteurs expliquent ces différences par l'existence d'une couche de cellules fibreuse sclérenchymateuse localisée dans la face externe du cortex qui limite l'absorption de l'azote ( $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ ) dans les régions âgées des racines du riz (Colmer et Bloom, 1998). Ce résultat et d'autres montrent que dans les racines la distribution et la densité des systèmes de transport de l'azote le long du système racinaire varient en fonction de l'espèce, de la nature de la source azotée (Lazof et al., 1992; Siebrecht et al., 1995), de l'âge (Clarkson et al., 1968), de l'activité métabolique de la zone racinaire (Silk et Erickson, 1980) et de l'anatomie des racines (Koncalova, 1990; Lazof et al., 1992; Colmer et Bloom, 1998) comme a été reporté pour l'eau par Rieger et Litvin (1999).

Selon ces auteurs la conductivité hydraulique du système racinaire et le gradient du potentiel hydrique minimum requis pour induire un flux dépendent de l'épaisseur du cortex racinaire, du diamètre racinaire et de la présence/absence de l'exoderme suberisé qui peuvent, en partie, causer une variabilité inter-spécifique dans les propriétés hydrauliques des racines (Rieger et Litvin, 1999).

Par ailleurs, ces différences dans la distribution spatiale des flux nets de  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$ , qui peuvent influencer les interactions entre ces deux ions au niveau de leurs sites d'absorption, peuvent aussi contribuer à bien comprendre l'inhibition de l'absorption nette du nitrate par l'ammonium qui est encore obscure (Aslam et al., 1994; Kronzucker et al., 1999a et 1999b). De part ces informations apportées par l'étude de Colmer et Bloom (1998), le fait que l'ammonium diminue l'absorption nette des nitrates alors que celle de l'ammonium n'est pas affectée par le nitrate amène ces auteurs à suggérer, comme l'ont déjà fait Ullrich et al. (1984), que l'inhibition de l'absorption du nitrate peut résulter d'une forte vitesse de l'influx de  $\text{NH}_4^+$  qui diminue la force proton motrice pour le transport des anions. Selon ces auteurs ce mécanisme peut expliquer l'inhibition à court terme seulement.

Le système racinaire comprend plusieurs ordres de racines secondaires différenciées, présentant toutes une croissance localisée dans la partie sub-apicale, et des profils basipètes de différenciation. Cette structure du système racinaire recouvre d'importantes hétérogénéités de capacité d'absorption. Par exemple, chez le maïs, un pic d'absorption s'observe dans la zone d'extension cellulaire, à quelques dizaines de millimètres de l'apex. L'apex qui semble être dépourvu de système d'absorption de nitrate à forte affinité (Lazof et al., 1992), importe l'azote absorbé dans les régions distales. Les racines latérales présentent une surface d'échange plus importante que celle des racines séminales (du fait de leur finesse et de leur abondance), qui en fait les sites majeurs d'absorption de  $\text{NO}_3^-$ .

Une autre indication de l'importance des racines latérales pour l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  est donnée par l'effet de cet ion sur le développement du système racinaire. Les ions  $\text{NO}_3^-$  étant très mobiles, il n'apparaît pas de zone d'épuisement aux abords du système racinaire dans les sols convenablement fertilisés (Robinson, 1986). Mais lorsque la distribution de  $\text{NO}_3^-$  est hétérogène dans le milieu, et la plante est carencée en N, les méristèmes initiateurs de racines latérales sont induits spécifiquement dans les régions où l'ion abonde (Grignon et al., 1997).

### **III. 6. 2. La partie aérienne**

Au terme de la phase initiale de l'induction, la capacité de transport du nitrate atteint un niveau d'autant plus élevé que le pré-traitement sans azote était plus long. Plus tard, si la

plante est maintenue en présence d'une source d'azote, on peut observer une diminution de cette capacité. Ces variations montrent que l'absorption racinaire est ajustée aux besoins de la plante en N et à la demande de la croissance par des signaux de carence et de satiété d'azote (Imsande et Touraine, 1994; Casadesus et al., 1995).

Selon l'hypothèse de la spécificité de la régulation de l'absorption ionique, le message informant les racines des besoins de la plante en un élément est la concentration de cet élément dans la sève élaborée (Touraine et al., 1994) comme pour les ions  $K^+$  et  $PO_4^-$  (Drew et Saker, 1984). Dans le cas du  $SO_4^{2-}$ , des expériences de privation en  $SO_4^{2-}$  utilisant le système "split root" montrent pour la première fois une régulation des gènes racinaires impliqués dans l'acquisition et l'assimilation des éléments nutritifs et en particulier le  $SO_4^{2-}$  par un signal qui est transporté des feuilles vers la racine (Lappartient et al., 1999). Le glutathione transporté dans le phloème est identifié comme la molécule de transduction inter-organes responsable de la régulation de la transcription des gènes de l'ATP sulfurylase et du transporteur de  $SO_4^{2-}$  ainsi que de la régulation de la vitesse d'absorption de  $SO_4^{2-}$  et de l'activité ATP sulfurylase des racines.

Dans le cas de  $NO_3^-$ , toutefois, même si sa concentration dans le cytoplasme est un effecteur de son absorption, cet ion ne peut pas être le signal informant les racines des besoins en N des parties aériennes du fait qu'il est peu (représente 1% de l'azote total transporté chez *Ricinus communis*, Jeschke et Pate, 1991; Peuke et al., 1996) ou pas transporté dans le phloème (Allen et Raven, 1987). D'autres signaux régulateurs informant les racines des besoins en N doivent exister (Casadesus et al., 1995; **chapitres 7 et 8**). Selon plusieurs chercheurs, ces signaux pourraient être les produits de l'assimilation de  $NO_3^-$  réalisée dans la partie aérienne (Touraine et al., 1994; Imsande et Touraine, 1994; Casadesus et al., 1995) ou d'autres facteurs tel que les phytohormones (Abdellaoui et al., 2001; Abdellaoui, 2001).

Selon Lin et Kauer (1985) plusieurs peptide alcools (Aryl-carbamoyl dipeptide alcohols) augmentent l'absorption de  $NO_3^-$ , l'activité ATPasique du plasmalemmes et l'activité de la glutamate synthase sans affecter l'activité NR. L'effet de ces composés, variable avec l'espèce, est plus prononcé quand la concentration du  $NO_3^-$  du milieu est faible. L'absorption de  $NO_3^-$  est stimulée chez le maïs, l'orge et le blé par ces substances tandis que les racines du riz, du sorgho et du coton sont insensibles. L'application de ces substances à faible dose (50 ppm) sur les feuilles stimule la croissance de plantes déficientes en  $NO_3^-$  et le flux de nitrate à travers les racines. Ces auteurs suggèrent donc que ces composés sont transportés des sites de leurs applications (feuilles et tiges) vers leurs sites d'actions (racines) et peuvent être considérés eux-mêmes comme des effecteurs ou précurseurs des molécules servant au

contrôle de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par la partie aérienne s'ils se trouvent synthétisés dans cet organe.

Des mécanismes de régulation de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  les plus puissants faisant appel à un transfert de molécules signalétiques des feuilles vers les racines (Touraine et Gojon, 1997) ont été démontrés par une série d'expériences reposant sur l'emploi de dispositifs "split root". Une privation de  $\text{NO}_3^-$  d'une partie du système racinaire provoque une augmentation de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  de la partie maintenue sur  $\text{NO}_3^-$  chez le maïs (Edouards et Barber, 1976) et le blé (Simpson et al., 1982). Une privation en N diminue l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  et des sucres, tandis qu'en absence de privation l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  augmente légèrement et l'efflux des sucres augmente considérablement (**chapitre 6**). A faible éclaircissement et en absence de carence, l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  croît considérablement tandis que l'efflux des sucres augmente légèrement (BenDriss Amraoui et Talouizte, 2001, **chapitre 6**). Ces réponses montrent que des signaux spécifiques informant les racines des besoins nutritionnels de la plante sont émis par la partie aérienne vers les racines (Touraine et al., 1994; Touraine et Gojon, 1997; BenDriss Amraoui et Talouizte, 2001). Nos résultats montrent également, pour la première fois, qu'un transfert de molécules signalétiques de la partie aérienne vers les racines (glucides, acides organiques ou autres) affecte les pertes des nitrates et des sucres via les processus d'assimilation du  $\text{NO}_3^-$ , de la respiration et du catabolisme des glucides dans les racines (BenDriss Amraoui et Talouizte, 2001).

Les acides organiques, les acides aminés, les sucres, les composés phosphatés et le potassium sont les composés principaux de la sève phloémique (Richardson et al., 1982; Touraine et al., 1994). Les trois premiers produits sont des candidats potentiels pour le rôle de signal de régulation de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par les feuilles du fait qu'ils sont principalement formés dans la partie aérienne et affectent l'absorption de  $\text{NO}_3^-$ .

Une circulation intense d'acides aminés entre racines et partie aérienne a été trouvée par plusieurs chercheurs (Simpson et al., 1982a, 1983; Keltjens et al., 1986; Vessey et Layzell, 1987; Touraine et al., 1988, 1994) durant différents stades de développement (Lambers et al., 1982; Cooper et Clarkson, 1989; Larson et al., 1991). A peu près 2/3 de l'azote réduit transporté vers les feuilles est reconduit vers les racines (Larson, 1992). Cooper et Clarkson (1989) suggèrent qu'un pool d'acides aminés libres correspondant aux acides aminés impliqués dans le transport xylémique et phloémique, module l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  selon les besoins en N de la plante (Larsson et al., 1991). Par exemple, si l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  dépasse les besoins en N, la sève élaborée devient riche en acides aminés et inhibe l'absorption (Touraine et al., 1994).

Le modèle de Ben-Zoni et al. (1971) repris par Touraine et al. (1992) propose un contrôle de l'absorption racinaire du nitrate par la réduction de celui-ci dans la partie aérienne. Dans les feuilles, la synthèse des acides aminés à partir de  $\text{NO}_3^-$  est souvent associée à une production d'ions hydroxydes ( $\text{OH}^-$ ) (Raven et Smith, 1976; Touraine et Gojon, 1997). Ces ions basiques, ne pouvant pas être stockés dans l'espace extra-cellulaire ni même véhiculés par le phloème (Raven, 1977, 1985; Allen et Raven, 1987; Touraine et al., 1988), doivent être excrétés ou neutralisés pour que le pH cytoplasmique soit maintenu à une valeur constante (Raven et Smith, 1976) par l'action du pH-stat biophysique et biochimique (Raven, 1985; Davies, 1986). Pour neutraliser ces  $\text{OH}^-$  les cellules synthétisent grâce au pH-stat biochimique du malate à partir du phosphoenolpyruvate par la PEP carboxylase et la malate déshydrogénase (Davies, 1973; Raven et Smith, 1976; Raven, 1985; Davies, 1986). Celui-ci transporté, en compagnie d'un ion  $\text{K}^+$ , vers les racines pourrait moduler l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  en stimulant l'influx par un antiport  $\text{NO}_3^-/\text{HCO}_3^-$  (Touraine et al., 1988) et réduisant l'efflux (Abdellaoui, 2001).

L'alimentation d'une partie des racines par du  $\text{NO}_3^-$  permet une stimulation de la réduction dans la partie aérienne et une augmentation de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$ , tandis qu'une alimentation par le tungstate cause une inhibition de la réduction dans les feuilles et une diminution de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  (Gojon et al., 1991). Un apport de malate aux racines stimule l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  et la restaure lorsqu'elle est empêchée par arrêt du transport de la sève élaborée (Touraine et al., 1988, 1992, 1994). L'augmentation du transfert du malate des feuilles vers les racines, par une alimentation d'une partie des racines avec le malate, stimule l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par la partie des racines non traitée. Ces observations sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle les acides organiques peuvent être des signaux foliaires par lesquels les feuilles régulent l'absorption de nitrate via le métabolisme de l'azote foliaire.

Par ailleurs, les acides aminés pourraient être responsables du contrôle de l'absorption racinaire de  $\text{NO}_3^-$  par le statut nutritionnel azoté de la partie aérienne. L'absorption racinaire de  $\text{NO}_3^-$  étant généralement bien inférieure à la capacité d'absorption des racines, elle est probablement réprimée chez des plantes bien alimentées en N, sa stimulation par la carence correspondant en réalité à la levée de cette inhibition. Ceci suggère que la vitesse d'absorption de  $\text{NO}_3^-$  est normalement sous un contrôle négatif et donc est probablement plus déprimée par un signal de satiété que stimulée par un signal positif de demande en N. Partant de cette idée les chercheurs s'accordent sur le fait qu'il faut rechercher un signal de satiété chez les plantes bien alimentées en N plutôt qu'un signal de demande chez les plantes carencées. Le fait que la concentration des acides aminés libres circulant dans la plante est dépendante de l'écart entre

l'alimentation et les besoins en N des feuilles, est en faveur de cette hypothèse, et suggère que les acides aminés soient ce signal de satiété. Par contre, la stimulation de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par les acides organiques, en assurant la coordination de l'absorption racinaire et de la réduction foliaire de cet ion, permettrait d'absorber des ions  $\text{NO}_3^-$  pour compenser ceux qui sont consommés par le métabolisme assimilateur de l'azote. En fait selon Touraine et al. (1994), les acides aminés semblent impliquer dans l'homéostasie de l'azote organique et les acides organiques dans l'homéostasie de  $\text{NO}_3^-$ .

On ne dispose pas de données directes sur la réponse des systèmes d'absorption lorsque les effets opposés de ces deux types de composés sont appliqués simultanément par la partie aérienne sur les racines. On ne peut non plus discuter la prépondérance d'un système de régulation sur l'autre. Par contre, on connaît que le transport dans la sève élaborée de ces deux types de signaux varie d'une façon opposée et que leur actions vont dans le même sens (Touraine et Gojon, 1997). Un exemple de coordination de l'absorption racinaire de  $\text{NO}_3^-$  par les acides aminés et organiques est illustré par le modèle du Soja proposé par Imsande et Touraine (1994) et Touraine et Gojon (1997).

Ces auteurs pour expliquer la diminution d'absorption de  $\text{NO}_3^-$  au cours du remplissage reportent que quand la plante est en croissance végétative active, l'assimilation foliaire de  $\text{NO}_3^-$  est élevée entraînant une forte production d'acides organiques et d'acides aminés (Fig. 4). Les acides organiques sont exportés en majorité vers les racines, alors qu'une grande partie des acides aminés est utilisée localement pour la synthèse protéique (vegetative storage proteins, Staswick et al., 1991). Tandis que pendant la phase de remplissage des graines, ces protéines sont remobilisées, leur abondance passant de 15% à 1% des protéines foliaires.

Alors que la synthèse de ces protéines foliaires maintenait le transport phloémique à un niveau relativement bas, leur remobilisation libérerait des acides aminés qui sont injectés dans le pool circulant de la plante. Simultanément à cette augmentation de la vitesse d'exportation d'acides aminés, la réduction foliaire de  $\text{NO}_3^-$  déclinant pendant le remplissage des graines, la production nette d'acides organiques dans les feuilles diminue et la disponibilité de  $\text{HCO}_3^-$  dans les racines baisse (Touraine et Gojon, 1997) et provoque ainsi une chute de l'absorption.





### III. 7. Régulation par la croissance

L'absorption nette des nitrates est beaucoup plus dépendante de la demande en azote générée par la croissance de la plante que par l'environnement des racines (Touraine et Gojon, 1997). L'existence de mécanismes de régulation qui adaptent l'absorption racinaire de  $\text{NO}_3^-$  à la demande globale de la plante est démontrée par deux types de phénomènes: (i) l'absorption racinaire est corrélée à l'accumulation de protéines végétatives de réserve foliaires et à la croissance des parties aériennes et (ii) la carence en azote augmente la surface et la capacité d'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par les racines (Talouizte et al., 1984a, 1984b; Jarvis et MacDuff, 1989; Lainé et al., 1995; Touraine et al., 1994; Touraine et Gojon, 1997).

L'existence d'un tel contrôle est également attestée par l'observation suivante: à une disponibilité en nitrate constante, la vitesse d'absorption de  $\text{NO}_3^-$  est étroitement corrélée à la vitesse de croissance de la plante (Pitman, 1988). Des variations de la vitesse de croissance par des facteurs non spécifiques au métabolisme de l'azote provoquent des variations similaires de la vitesse d'absorption et l'accumulation de nitrate dans la plante suit à peu de chose près la même dynamique que celle de la biomasse ou de la fixation nette de carbone (Gastal et Saugier, 1989). L'ensemble de ces résultats aboutit à la conclusion évoquée plus haut (entre la croissance et l'absorption) et suggèrent un ajustement très fin des systèmes d'absorption, pour permettre à l'absorption de suivre de très près les besoins en N de la plante pour la croissance, par des signaux de répression/dérépression qui doivent être le reflet du statut nutritionnel azoté de la plante.

Plusieurs autres études montrent également que l'absorption des nitrates est généralement déterminée par la vitesse de croissance (Raper et al., 1978; Lemaire et Salette, 1984; Rodgers et Barneix, 1988; Swiader et al., 1991). Chez les plantes supérieures la vitesse d'absorption nette de nitrate (VANN) est intimement liée à la vitesse de croissance relative (VCR, Rodgers et Barneix, 1989). A des conditions non limitatives en N, la VANN est sous le contrôle de mécanismes régulateurs internes (Imsande et Touraine, 1994) comme ceux impliquant la VCR et la concentration en N de la plante (Clement et al., 1978b; Clarkson, 1985; Rodgers et Barneix, 1989; Ter Steege et al., 1998) qui ajustent l'absorption de l'azote aux besoins de la croissance de la plante.

L'une des démonstrations les plus claires sur la relation stricte entre l'absorption nette des nitrates et la vitesse de croissance a été obtenue par des expériences sur *Lolium* cultivée sur  $\text{NO}_3^-$  (Clement et al., 1978b). Des études sur l'effet de l'intensité de lumière sur la vitesse de croissance ont montré une étroite corrélation positive entre l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  et la vitesse de croissance (Clement et al., 1978b; Swiader et al. 1991; Devienne et al., 2000). Une

augmentation de la concentration de  $\text{NO}_3^-$  externe ne stimule l'absorption que si elle provoque une augmentation de la vitesse de croissance (Lemaire et Salette, 1984; Rodgers et Barneix, 1988, 1989; Swiader et al. 1991). Ces observations montrent que l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  est contrôlée par un mécanisme endogène qui assure l'homéostasie de la teneur en azote de la plante, pour subvenir aux besoins de la croissance, plutôt que par l'environnement racinaire (Touraine et al., 1994, Imsande et Touraine, 1994; Touraine et Gojon, 1997). Cependant, elles donnent peu d'indications sur les relations de la VCR avec les deux composantes de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  (l'influx et l'efflux).

Chez l'épinard, des changements à la fois de l'influx et de l'efflux en relation avec la VCR ont été trouvés: une VCR élevée est accompagnée par un influx du nitrate élevé et un faible efflux de nitrate. Bien que de larges variations de l'influx du nitrate sont la cause majeure des différences de la VANN dues à la VCR, les variations de l'efflux contribuent aussi substantiellement à ces variations de la VANN (Ter Steege, 1996). Similairement, chez *Brassica napus* les deux flux répondent aux différences de la VCR (MacDuff et al., 1994).

Ter Steege et al. (1999) reportent que le signal(s) dû à la VCR détermine d'une manière prédominante les flux de nitrates. A une VCR élevée ( $0.25\text{g.g}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ ), l'influx du nitrate est de 20 à 40% plus faible et l'efflux de nitrate est de 50 à 70% plus faible qu'à une faible VCR ( $0.17\text{g.g}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ ). Le rapport efflux/influx diminue de 0.5 à faible VCR à 0.2 à VCR élevée. Ces observations montrent donc que l'efficacité de la VANN augmente substantiellement avec l'augmentation de la VCR. Cette diminution des flux de nitrates quand la VCR est élevée n'induit pas à une VANN inadéquate, étant donné que chez les deux types de plantes (fast-growing et slow-growing), la VANN mesurée par ces auteurs est suffisante pour supporter les VCR observées, indiquant que ces variations de flux ne sont pas dues à un stress mécanique ou à des perturbations (Ter Steege et al., 1998).

Ils ont également trouvé que les fast-growing plantes allouent plus de masse de matière sèche aux racines accompagnée par une concentration élevée en N dans ces organes. Ils expliquent ceci par une élévation de la translocation de N réduit des feuilles vers les racines ou une augmentation de la vitesse de réduction et assimilation du nitrate. De la même manière, chez ces plantes à VCR élevée l'augmentation du flux de nitrate vers la voie de réduction est probablement responsable aussi de la diminution de l'efflux à partir de ces plantes (Ter Steege et al., 1999). Cette contribution de la réduction, en réponse aux besoins de la racine en N pour la croissance, est confirmée par d'autres expériences avec l'épinard. Chez cette plante Ter Steege (1996) trouve une VCR élevée (demande en N élevée) accompagnée par un influx de nitrate élevé résultant d'une faible concentration en azote réduit (faible

réduction) au niveau du site régulateur de l'absorption dans les racines.

Ces auteurs et d'autres (Clarkson, 1998; Scheurwater, 1999) reportent que l'augmentation de la VCR diminue le coût énergétique respiratoire de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  comme a été suggéré précédemment par Poorter et al. (1991) et Van der Werf et al. (1992). Cette faible consommation d'énergie par l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  chez les fast-growing plantes est attribuée par ces auteurs à l'importante diminution de l'efflux de nitrate par la VCR élevée de ces plantes.

Le fait que l'absorption des nitrates soit généralement régulée par la VCR suggère qu'elle peut être modulée, au moins en partie, directement ou indirectement par les substances régulatrices de la croissance et il est même probable que les signaux de demande nutritionnelle soient des hormones (Abdellaoui, 2001; Abdellaoui et al., 2001). Cette hypothèse a été discutée par Touraine et al. (1994) et Touraine et Gojon (1997) à la base des réponses hormonales aux conditions de stress nutritionnels trouvées par plusieurs chercheurs (Radin et Matthews, 1989; Chapin, 1990; Davies et Zhang, 1991; Clarkson et Touraine, 1994). On sait que la carence en  $\text{NO}_3^-$  provoque une augmentation de la synthèse d'acide abscissique (ABA) ou de son transport xylémique des racines vers la partie aérienne et une diminution de la synthèse des cytokinines (Clarkson et Touraine, 1994). En revanche, le fait que les réponses à la carence en  $\text{NO}_3^-$ , en  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ou en  $\text{SO}_4^{2-}$  (Radin et Matthews, 1989) impliquant l'ABA sont identiques, suggère qu'il ne s'agit pas là d'une régulation spécifique de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$ . Toutefois, les hormones en affectant la croissance et/ou le développement de la plante, peuvent modifier l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  (Touraine et Gojon, 1997). Elles seraient donc impliquées dans une réponse générale au stress (Chapin, 1990; Davies et Zhang, 1991).

Cette hypothèse est renforcée par la similitude entre ces réponses aux stress nutritionnels et les réponses au stress hydrique (Clarkson et Touraine, 1994). Les hormones ne semblent pas directement impliquer dans l'ajustement spécifique de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  aux besoins de la plante, comme le montre l'absence de stimulation de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par la fourniture exogène d'ABA (Chapin et al., 1988). Les hormones étant impliquées dans les modifications de la vitesse de croissance, interviendraient donc indirectement. Par exemple, les adaptations morphologiques observées après une carence en nitrate (augmentation du rapport racines/feuilles) seraient dues à une coordination du développement des parties aériennes et des racines par l'ABA qui en allouant davantage de carbone aux racines augmente la surface et la capacité d'absorption.

Selon Lainé et al. (1995), les signaux cellulaires provenant de la partie aérienne et

informant les racines des besoins nutritionnels ne sont pas des hormones. Ceci rend peu vraisemblable l'hypothèse d'un contrôle hormonal des systèmes d'absorption. En revanche, les résultats de Abdellaoui et al. (2001) et Abdellaoui (2001) contredisent ses hypothèses et montrent que l'auxine, hormone impliquée dans la régulation de l'élongation cellulaire et dans le métabolisme pariétal, est susceptible d'être le signal foliaire par lequel l'absorption racinaire peut être régulée via son effet sur l'efflux du nitrate.

Cependant, des expériences complémentaires sur l'effet stimulateur observé par ces auteurs restent à réaliser tant qu'une relation entre le système de l'efflux et les voies de synthèse des auxines dans les racines ou entre l'efflux et le transport des auxines du bourgeon vers les racines n'a pas encore été établie. En effet, du fait qu'on sait qu'une application exogène des auxines induit après seulement quelques minutes (10 min) une acidification du cytosol (efflux de proton et activation de la pompe ATPasique) et une élongation cellulaire spectaculaire (acid growth theory for the underlying mechanism of auxin action, cité par Keller et Van Volkenburgh, 1998), il serait important de vérifier si l'effet des auxines sur l'efflux du nitrate, observé par ces auteurs, est un effet direct ou une conséquence ou bien une adaptation rapide des cellules racinaires à la stimulation de la  $H^+$ -ATPase par les auxines.

Il serait également important de connaître si c'est un effet sur le système de l'efflux ou sur le système de l'influx (HATS et LATS) si on suppose que l'augmentation de l'efflux peut être due à une réduction de l'activité du HATS par l'auxine qui en empêchant ce dernier de ré-absorber le nitrate efflué stimule l'efflux de  $NO_3^-$ , comme il a été trouvé pour l'effet de la salinité sur l'efflux et l'influx du glucose (Sacchi et al., 2000).

Par ailleurs, dans une étude sur l'influence des substances humiques sur l'absorption du nitrate, Pinton et al. (1999) et Cocco et al. (2000) trouvent que ces composés stimulent l'induction du système de transport de  $NO_3^-$ , la synthèse de la protéine du transport (et probablement l'expression du transporteur), l'absorption de  $NO_3^-$ , et l'activité de la pompe à proton (ATPase) et que l'effet des substances humiques sur l'ATPase est indépendant de la présence du nitrate et est additif à celui exercé par le nitrate lui-même sur la pompe (Pinton et al., 1999). Cependant, une relation entre le pH externe et l'expression du gène CHL1 du transporteur de nitrate chez *Arabidopsis* a été montrée par Tsay et al. (1993). Une élévation du pH externe produit un niveau élevé et constant de l'ARNm du CHL1. Deux heures après acidification du milieu, ces auteurs obtiennent une stimulation de l'expression du CHL1 même en absence du nitrate dans le milieu. Basé sur cette dernière observation Pinton et al. (1999) suggèrent une relation entre l'absorption de  $NO_3^-$  et l'activité ATPase des racines et concluent que les substances humiques en interaction avec l'activité de la pompe ATPase

modulent l'absorption du nitrate plus que le nitrate lui-même. Toutefois, la nature des transporteurs nouvellement synthétisés sous l'effet des substances humiques et le mécanisme moléculaire impliqué dans la liaison entre la  $H^+$ -ATPase et l'absorption du nitrate restent toujours très mal connus. D'autre part, un effet physiologique de ses substances humiques semblable à celui de l'activité des hormones a été montré par Cacco et Dell'Agnola (1984).

L'ensemble de ces données montrent que l'activation de la pompe à proton, par une substance dont l'activité est semblable à celle des hormones, semble plutôt favoriser l'absorption et l'influx que l'efflux des éléments nutritifs et en particulier des nitrates (Pinton et al., 1999; Cocco et al., 2000). De ce fait, l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de l'efflux du nitrate par les auxines serait une conséquence de l'activation de la pompe par les auxines (Abdellaoui, 2001) devient peu vraisemblable à moins que l'efflux soit un processus actif nécessitant l'ATP et l'activation de l'ATPase chez le blé comme a été trouvé par Aslam et al. (1996a) chez l'orge.

Une activation de la pompe peut engendrer un efflux de  $K^+$  et des sucres par un antiport ( $K^+/H^+$  et sucres/ $H^+$ ) en cas d'un choc hypo-osmotique (Walker et al., 2000) pour la régulation de la turgescence (effect of turgor in a coupled chemiosmotic system). Toutefois, ces auteurs remarquent que l'influx des protons  $H^+$  à travers la membrane plasmique est beaucoup plus faible que l'efflux de  $K^+$  et des sucres et suggèrent alors que des anions soient exsudés aussi pour accompagner le  $K^+$ . Ceci montre que l'efflux des anions dépend plus de l'efflux des cations endogènes que de l'influx des protons  $H^+$ , suggérant que l'accroissement de l'efflux par les auxines, qui active aussi l'ATPase, peut se produire par un mécanisme utilisant l'influx des protons  $H^+$  et l'efflux des cations.

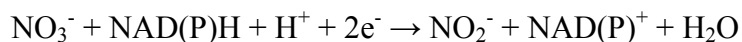
Toutefois, cet effet des auxines sur l'efflux peut être dû aussi à l'effet connu de cette hormone (acid growth theory) sur les parois cellulaires. Cette dernière hypothèse peut être vérifiée par le dosage d'autres composés (potassium, acides aminés, acides organiques, sucres et protéines) dans les exsudats racinaires en présence et absence d'auxine dans le milieu, ainsi que par l'effet des auxines sur l'absorption et l'influx du  $NO_3^-$ .

#### **IV. Assimilation des nitrates**

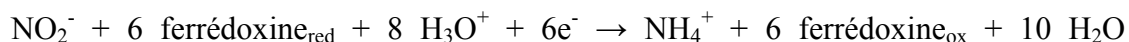
Le nitrate prélevé du sol est transféré dans la stèle, assimilé dans les racines, accumulé dans la vacuole ou exsudé dans le milieu (Fig. 5). La concentration cytosolique en  $NO_3^-$  est la résultante de plusieurs flux: l'influx à partir du milieu, l'efflux dans le milieu, le flux cytoplasme-vacuole, le flux vacuole-cytoplasme, le flux d'assimilation et le flux vers les feuilles (Faure et al., 1997). Le  $NO_3^-$  nouvellement absorbé est rapidement réduit et/ou transporté vers les feuilles. Les nitrates pré-existants dans les racines sont transportés vers les

feuilles ou libérés dans le milieu mais ne sont pas assimilés, ceci révèle une complexité de compartimentation de  $\text{NO}_3^-$  cellulaire et tissulaire (MacKown et al., 1983).

La voie d'assimilation du nitrate comprend la réduction du nitrate en nitrite dans le cytoplasme par la NR (Kleinhofs et Warner, 1990):



puis la réduction du nitrite en ammonium dans les plastes ou chloroplastes par la NiR:



L'assimilation du nitrate au sens strict implique seulement ces deux réactions catalysées par la NR et la NiR situées dans les racines et les feuilles. Elle est principalement foliaire chez les plantes herbacées. Cependant, cette distribution apparaît dépendre de plusieurs facteurs: l'espèce, les conditions climatiques et la nutrition nitrique (Andrews, 1986; Andrews et al., 1984, 1992; Sechley et al., 1992). En revanche, elle est souvent plus importante dans les racines que dans les feuilles chez les ligneux (BenDriss Amraoui, 1988). L'assimilation totale du nitrate en composés azotés est tributaire de la respiration et la photosynthèse du fait qu'elle nécessite de l'énergie, du pouvoir réducteur et des squelettes carbonés. D'après Bloom et al. (1992), 80 à 90% du coût total de l'absorption et l'assimilation est consommé par l'assimilation de  $\text{NO}_3^-$  dans les racines. Par exemple, les variations d'intensité respiratoire, en réponse à l'addition de  $\text{NO}_3^-$  chez le type sauvage et chez des mutants d'orge sans NR, permettent d'estimer que 23% de la respiration de la racine servent à assimiler  $\text{NO}_3^-$ , dont seulement 5% pour l'étape d'absorption.

C'est une voie métabolique associée à différents types de cellules (épiderme, cortex et stèle) et nécessitant plusieurs compartiments: le plasmalemm, le cytoplasme, les plastes ou chloroplastes et les peroxyosomes (Rufty et al., 1986; Sechley et al., 1992). La NR est localisée dans le cytosol de la majorité des systèmes végétaux étudiés, mais une forme membranaire existerait chez certaines espèces (Sechley et al., 1992). En effet, Stöhr (1999) trouve une relation entre l'alimentation en nitrate, la vitesse de croissance, la NR (membranaire et cytosolique), et la teneur en nitrates endogènes chez le tabac. Cet auteur reporte aussi que ces deux enzymes sont régulées différemment par la concentration du nitrate exogène.

Plusieurs mécanismes ont été postulés pour expliquer pourquoi les cellules du cortex et de la stèle ont une faible capacité d'induction de NR et de réduction du nitrate par rapport aux cellules de l'épiderme à une concentration en  $\text{NO}_3^-$  de 20 mM et ont une capacité nulle à 0.2 mM de  $\text{NO}_3^-$  même si le nitrate est transporté via le système vasculaire (Rufty et al., 1986).





Ces auteurs suggèrent alors que (i) le système biochimique impliqué dans l'induction de la NR du cortex et de la stèle est relativement insensible à la présence du nitrate, (ii) le récepteur du signal pour l'induction de la NR et la protéine NR sont associés au plasmalemme et peu de nitrate est absorbé par les cellules du cortex et de la stèle, et/ou (iii) le nitrate est compartimenté durant le transport à travers le symplasme, qui limite son exposition pour induire la NR et la réduction du nitrate.

#### **IV. 1. La nitrate réductase**

La nitrate réductase de plantes est une enzyme soluble qui catalyse la réduction du nitrate en nitrite par le transfert de deux électrons du NADH ou du NADPH au  $\text{NO}_3^-$ . La forme de la NR utilisant spécifiquement le NADH (NADH: NR, EC 1.6.6.1) est la forme la plus commune chez les plantes supérieures et les algues. Il existe deux autres isoformes: une isoforme bispécifique (NAD(P)H: NR, EC 1.6.6.2), présente chez quelques mousses (*Sphagnum*), algues (*Chlamydomonas*) et plantes, en association avec la NADH: NR dans les feuilles ou comme unique forme dans les racines (Rouzé et Caboche, 1992); une isoforme spécifique du NADPH (NADPH: NR, EC 1.6.6.3) qui est présente chez les champignons et les mousses, mais absente chez les plantes supérieures (Faure et al., 1997).

Les faibles quantités de l'enzyme, sa complexité ainsi que son instabilité protéolytique due à la grande taille de ces chaînes polypeptidiques rend très difficile les études biochimiques de cette enzyme chez les plantes (Campbell, 1996, 1999; Mertens et al., 2000). De ce fait, la plupart des études qui ont permis de faire les premiers pas dans ce domaine au niveau moléculaire ont été réalisées pour la plus grande part sur des levures (Shiraishi et Campbell, 1997; Su et al., 1997; Higgins et Cregg, 1998; Shiraishi et al., 1998).

La NADH: NR est une enzyme homodimérique qui peut former des tétramères à haute concentration chez la chlorelle et quelques plantes supérieures (Redinbaugh et Campbell, 1985). Les monomères de la NR sont liés entre eux par un pont disulfure pouvant être réduit sans perte d'activité. Le monomère est composé d'un polypeptide de 100 à 110 kDa auquel est lié trois cofacteurs: le FAD, l'hème (de type cytochrome b557) et le cofacteur à molybdène (Mo-co). Chaque groupement constitue un domaine fonctionnel (Fig. 6). L'interaction entre les monomères se fait au niveau du domaine à Mo-co. Les trois domaines avec leurs groupements prosthétiques, FAD-hème-Mo-co dans l'ordre, permettent le transfert des deux électrons provenant du NADH au  $\text{NO}_3^-$ . In vitro ces électrons peuvent être issus d'autres donneurs que le NADH ou être acceptés par d'autres receveurs que le  $\text{NO}_3^-$  (Faure et al., 1997, Campbell, 1999).

## **IV. 2. La nitrite réductase**

C'est une enzyme monomérique de 60 à 64 kDa avec un groupement prosthétique de type sirohème et un groupement 4Fe-4S comme centre actif (Fig. 7). Le sirohème est une tétrahydroporphyrine à fer ferreux du type de l'isobactéριοchlorine avec 8 chaînes latérales contenant des acides carboxyliques. Le donneur d' $e^-$  physiologique dans les tissus photosynthétiques est la ferrédoxine. Pour les racines, le donneur d' $e^-$  est une protéine de type ferrédoxine qui est réduite par une pyridine nucléotide réductase au moyen d' $e^-$  provenant du cycle des pentoses phosphate (Faure et al., 1997).

## **V. Régulation de la NR et la NiR**

La NR est une enzyme centrale dans le métabolisme de l'azote. Elle joue un rôle clé dans la régulation de l'acquisition du nitrate, dans la conversion du nitrate en ammonium et dans l'incorporation de l'azote inorganique dans les constituants cellulaires tels que les acides aminés et les acides nucléiques (Solomonson et Barber, 1990; Campbell, 1999). Le flux d'azote réduit est gouverné par plusieurs mécanismes régulateurs.

### **V. 1. L'azote, le carbone et la lumière**

Le nitrate induit l'expression de la NR par augmentation du taux de son ARNm (Vincentz et Caboche, 1991; Sivasankar et al., 1997; Fig. 8), tandis que le saccharose et la lumière favorise cette induction. Elle est très rapide puisqu'elle se produit seulement quelques minutes après l'ajout de  $\text{NO}_3^-$ . L'accroissement d'ARNm produit une élévation de la synthèse de la protéine NR et ensuite de son activité dans le système racinaire puis dans la partie aérienne. Une élévation de la concentration de  $\text{NO}_3^-$  externe augmente le taux d'ARNm et la protéine NR (Sechley et al., 1992). De même, Li et Oaks (1993) ont montré que le nitrate influence l'induction et le turnover de la NR du maïs. Récemment, Stöhr (1999) a montré que le nitrate régule aussi l'activité de la NR et ceci d'une manière différente selon que la NR est localisée dans le plasmalemm (PM-NR) ou dans le cytosol (cNR).

L'activité de la cNR racinaire est élevée à faible concentration en nitrate avec un maximum à 5 mM et chute à de faibles valeurs au delà de 5 mM. Au contraire, l'activité de la PM-NR racinaire augmente avec les concentrations élevées en nitrate avec un maximum à 25 mM et diminue clairement seulement à 40 mM. Cet auteur a trouvé aussi que cette haute activité de la PM-NR est corrélée avec une faible vitesse de croissance et pourrait être une des réponses à un excès de nitrate. La teneur en nitrate tissulaire augmente avec la diminution de l'activité de la PM-NR au delà d'une concentration de nitrate de 25 mM, indiquant une relation inverse entre la teneur en nitrate des tissus et l'activité de la PM-NR.







Dans les feuilles, les deux activités de la NR (cNR et PM-NR) sont corrélées avec la teneur interne en nitrate, mais avec une réponse différente à faible concentration en nitrate externe (Stöhr, 1999). Ces observations montrent que la réponse de la NR à la disponibilité en nitrate et l'activité NR impliquée dépendent de l'organe en question et suggèrent que la PM-NR bien qu'elle soit membranaire joue un rôle très important dans la régulation de la teneur en nitrate et la croissance de la plante.

Inversement une carence diminue rapidement l'activité et la protéine NR, alors que le niveau d'ARNm se maintient plusieurs jours. Il existe des formes constitutives de la NR insensibles à un apport de nitrate. Il y a aussi des isoformes toujours présents à un niveau de base significatif et inductible par  $\text{NO}_3^-$ .

Le  $\text{NO}_3^-$  contrôle positivement la NiR par stimulation de son induction au niveau transcriptionnel (Back et al., 1991; Rouzé et Caboche, 1992). Chez les champignons filamenteux, la glutamine réprime les gènes NR et NiR. Cette répression domine l'effet inducteur du nitrate. Chez les plantes de tabac l'addition de glutamine diminue l'ARNm de NR seulement dans les racines mais non dans les feuilles. Cette diminution est observée uniquement en présence de faible concentration en nitrate, montrant que cette répression n'est pas dominante sur l'induction par  $\text{NO}_3^-$ . Il a été montré que la glutamine comme le glutamate réprime l'expression de la NR et la NiR quand celles-ci proviennent de feuilles détachées de plantes de tabac élevées à faible éclaircissement (Vincentz et al., 1993). La régulation de la NR par le nitrate, le saccharose et la glutamine se produit au niveau transcriptionnel, tandis que la régulation par la lumière se produit au niveaux transcriptionnel et post-translational (Melzer et al., 1989; Cheng et al., 1992; Vincentz et al., 1993; Li et al., 1995; MacKintosh et al., 1995). Toutefois, une modulation de la régulation post-translational de la NR par le nitrate, le saccharose et la glutamine comme par le pH cytoplasmique a été aussi montrée dans d'autres études (Kaiser et Spill, 1991; Heber et al., 1994; Scheible et al., 1997).

Dans une étude de la régulation de l'expression de la NR et NiR chez des cellules d'épinards en culture, Ogawa et al. (1999) obtiennent une répression de l'activité NR, par contre, celle de la NiR n'a pas été affectée par l'addition de la glutamine au milieu nutritif contenant le nitrate. De faibles niveaux de la protéine et de l'activité NiR sont observés quand le milieu contient seulement la glutamine comme source d'azote. Des changements dans les niveaux de l'ARNm de la NR et NiR montrent des modèles similaires à ceux des changements dans les niveaux des activités et protéines quand le milieu contient la glutamine. Ces résultats révèlent que la glutamine inhibe fortement l'expression de la NR, tandis que l'expression de la NiR n'est pas affectée par ce composé. Ils suggèrent que les gènes de la NR

et NiR pourraient être co-régulés par le nitrate mais non par la glutamine, et que l'expression des gènes de la NR et NiR pourrait être régulée par différents mécanismes en réponse à différents facteurs régulateurs chez les cellules d'épinards en culture. Cependant, ces résultats de Ogawa et al. (1999) contredisent ceux de Faure et al. (1991) et Vincentz et al. (1993) qui décrivent une co-régulation des gènes de la NR et de la NiR par la glutamine dans les feuilles de tabac. Ces différences révèlent une complexité dans la co-régulation de la NR et NiR par la glutamine ainsi qu'une grande variabilité génétique de ce processus.

Cette inhibition par la glutamine peut être en partie levée par un apport de sucres (Vincentz et al., 1993). Chez des feuilles bien développées à la lumière, la photosynthèse, grâce à la synthèse de sucres, a un effet antagoniste de l'inhibition par la glutamine (Faure et al., 1997). Après exposition des plantules de maïs au nitrate en présence de 1 mM d'asparagine ou de glutamine, la transcription et l'induction de l'activité NR et NiR sont réduites, tandis qu'en présence de 1% de saccharose elles sont stimulées (Sivasankar et al., 1997). L'addition du saccharose en même temps que ces amides annule la répression de la transcription de la NiR par les amides, tandis qu'elle diminue légèrement la répression pour la NR. Cet effet du saccharose sur l'inhibition de la NR et NiR par les amides est observé aussi pour l'induction de l'activité de la NR et NiR, mais à un niveau plus faible. Ces auteurs concluent que l'inhibition de l'induction des activités NR et NiR par les amides est un effet direct sur le système de réduction et non un résultat de l'altération de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par ces métabolites.

Dans une étude de l'effet des sucres sur la NR avec des mutants doubles de tabac, Klein et al. (2000) trouvent une sur-expression constitutive de la NR chez ces plantes qui contiennent des niveaux élevés de nitrate et de faibles niveaux de glutamine et autres acides aminés. Après transfert de ces plantes à une obscurité continue, le nitrate reste élevé et la glutamine faible, mais le niveau de transcription de la NR et la protéine NR diminuent significativement durant 24 h et sont indétectables après 48 h. La diminution du niveau de transcription du gène de la NR est totalement annulée alors que celle de la protéine NR est partiellement annulée quand les feuilles détachées de plantes maintenues à l'obscurité sont alimentées en saccharose à l'obscurité. La diminution n'est pas annulée par le nitrate ou les cytokinines. Ces auteurs observent aussi une disparition de la transcription du gène de la NR quand la teneur en sucre foliaire chute en dessous de  $4 \mu\text{mol}$  d'équivalent hexose  $\text{g}^{-1}$  MF, et se rétablit quand les sucres augmentent au dessus de  $8 \mu\text{mol}$  d'équivalent hexose  $\text{g}^{-1}$  MF. Ils concluent alors que la faible teneur en sucres réprime le gène de la NR et domine complètement les signaux dérivant du nitrate et du métabolisme de l'azote.

La lumière avec le nitrate complète l'expression de la NR et NiR. Cet effet est variable avec les espèces, les tissus et les conditions expérimentales. L'étude de l'effet de la lumière sur l'expression de la NR est complexe du fait qu'il est souvent difficile de dissocier celui lié au phytochrome ou autres récepteurs de la lumière (bleu et U.V) de celui lié à l'activité du système photosynthétique qui est un effet plus métabolique (Fig. 8). Chez *Spirodela polyrhiza* Lillo et al. (1998) montrent que la lumière rouge induit une augmentation de l'activité de la NR démontrant l'implication de phytochromes. En revanche, ces mêmes auteurs trouvent que la NR est principalement régulée par la photosynthèse, mais le signal dérivant de la photosynthèse n'est pas connu.

Dans les cotylédons et les plantes étiolées, l'action de la lumière est dépendante du phytochrome et induit la transcription de la NR et de la NiR suivie de l'expression de leurs activités (Sharma et Sopory, 1984; Rouzé et Caboche, 1992). Les phytochromes existent sous deux formes inter-convertibles, la forme active (Pfr), absorbe dans le rouge lointain (730 nm), alors que la forme inactive (Pr) en général, absorbe dans le rouge (665 nm). La transduction du signal lumineux démarre par la conversion de Pr en Pfr puis est véhiculé par l'intermédiaire de molécules comme le calcium, la calmoduline, les protéines G et la guanosine monophosphate cyclique. Ces molécules modulent l'activité de régulateurs négatifs de la photomorphogénèse: les protéines COP (constitutive photomorphogenic) et DET (deetiolated) (Faure et al., 1997) qui contrôlent l'expression du gène de la NR et autres protéines, le développement du chloroplaste, et les processus de l'élongation et de la différenciation cellulaire.

Chez les plantes supérieures la NR cytosolique à NAD(P)H est rapidement modulée par les conditions environnementales telles que la lumière, la disponibilité en CO<sub>2</sub> et en oxygène, le froid, les glucides, les produits de l'assimilation du nitrate et les cations divalents (Kaiser et Brendele-Behnisch, 1991; Kaiser et Spill, 1991; Bortel et al., 1996; Lillo, 1994; Vunkova-Radeva et Yaneva, 1997; Kaiser et al., 1999). Dans les feuilles, la NR atteint un état d'activation de 60–80% par la photosynthèse (Kaiser et al., 1999). A l'obscurité, ou après fermeture des stomates, la NR foliaire est inactivée. Elle diminue de 20 ou 40% de son activité maximale. Dans les racines, l'hypoxie ou anoxie active la NR, tandis qu'une alimentation élevée en oxygène l'inactive (Kaiser et al., 1999).

Cependant, Provan et Lillo (1999) montrent qu'après une inhibition de 97% de la fixation de CO<sub>2</sub> par un inhibiteur du cycle de Calvin (DL-glyceraldehyde) la NR reste encore active, suggérant à ces auteurs qu'une haute activité NR à la lumière n'est ni strictement liée au pool de ferrédoxine réduite ni à une haute activité du cycle de Calvin. L'abolition de la



régulation post-transcriptionnel de la NR empêche partiellement la diminution de la réduction de  $\text{NO}_3^-$  foliaire quand la photosynthèse est inhibée par une privation en  $\text{CO}_2$ , mais non à l'obscurité (Lejay et al., 1997). Ceci suggère que le  $\text{CO}_2$  ou les produits de son assimilation ont un effet post-transcriptionnel sur la NR.

Chez des plantes cultivées à la lumière puis mises à l'obscurité, les niveaux d'ARNm, des protéines et des activités NR et NiR diminuent lentement après 2 jours. Si ces plantes sont replacées à la lumière, les ARNm de NR et NiR atteignent leur niveau maximal rapidement après 4 à 6 h. L'addition de saccharose à des feuilles isolées de plantes cultivées à faible éclairément mime, complètement pour la NR et partiellement pour la NiR, l'effet de la lumière (Vincentz et al., 1993; Lillo, 1994). L'utilisation de plantes transgéniques confirme la nature transcriptionnelle de cette induction par les sucres (Vincentz et al., 1993).

La lumière a aussi un effet post-transcriptionnel sur la NR (Fig. 9). Des plantes transgéniques présentent une forte diminution de la protéine et de l'activité NR à l'obscurité même si le gène de la NR est exprimé et le niveau d'ARNm est normale. Si ces plantes sont ré-exposées à la lumière ou reçoivent du saccharose au niveau foliaire la protéine et l'activité NR sont ré-induites complètement ou partiellement, respectivement (Vincentz et al., 1993).

Cet effet peut s'exercer au niveau de la capacité de traduction de l'ARNm, de la stabilité de la protéine (Kandlbinder et al., 2000) ou directement au niveau de l'activité par phosphorylation/déphosphorylation et fixation de l'inhibiteur protéique, 14-3-3, à la forme phosphorylée de la NR (Huber et al., 1996; Moorhead et al., 1996; Kaiser et al., 1999; Campbell, 1999; Weiner et Kaiser, 1999; Fig. 9).

L'évidence de l'implication de la phosphorylation dans l'inactivation de la NR (EC 1.6.6.1) a été reportée chez plusieurs espèces (l'épinard: Kaiser et Spill, 1991; *Arabidopsis*: Su et al., 1996; le tabac: Nussaume et al., 1995; *Brassica campestris*: Kojima et al., 1995; le maïs: Merlo et al., 1995; et l'orge: Lillo et al., 1996).

En générale, la forme phosphorylée de la NR est assumée prédominer la forme déphosphorylée à l'obscurité et vice versa. A l'obscurité la NR subit une inactivation réversible dépendante du  $\text{Mg}^{2+}$  qui affecte la  $V_m$  de la réaction mais non son  $K_m$ . Cette inactivation est liée à une phosphorylation de la NR car une addition de MgATP inactive la NR tandis que l'AMP la réactive en interrompant la formation du complexe inactif NR phosphorylée:protéine 14-3-3 (14-3-3) (Athwal et al., 1998). Ce type de régulation nécessite la présence du  $\text{Mg}^{2+}$  car la formation du complexe NR phosphorylée:14-3-3 requière un cation divalent (MacKintosh et al., 1995; Athwal et al., 1998).



Les inhibiteurs des phosphatases empêchent l'activation de NR par la lumière. Le site où se fait la régulation par phosphorylation est localisé dans la région hingue 1 de l'homodimer de la NR. L'inactivation se fait en deux temps: tout d'abord une kinase de 67 kDa phosphoryle la NR sur un résidu serine-543 ou serine-534 qui est l'accepteur du phosphate (variable avec les espèces, Campbell, 1999) situé dans la charnière séparant le domaine à Mo-co et le domaine à hème (Douglas et al., 1995). A ce stade, la NR est encore active. Ensuite, une protéine inactivatrice de 100 kDa (14-3-3) se fixe sur la NR phosphorylée pour l'inactiver (MacKintosh et al., 1995; Douglas et al., 1995; Bachmann et al., 1996; Lillo et al., 1997). C'est la phosphorylation de la serine qui permet cette fixation. A une concentration élevée de la 14-3-3 (30 nM), presque 90% de l'inactivation complète est achevée après 75 secondes (Lillo et al., 1997). Même à cette forte concentration, une forte dépendance du temps a été observé par ces chercheurs. Toutefois, a faible concentration, plusieurs minutes s'avèrent nécessaires pour obtenir un équilibre entre la 14-3-3 et la NR

La NR foliaire de l'épinard est inactivée par phosphorylation de la serine-543 et fixation de la 14-3-3  $Mg^{2+}$ -dépendante (Kaiser et al., 1999). Au moins trois différentes protéines kinases (NR-PKs) ont été identifiées dans les feuilles de l'épinard qui sont capable de phosphoryler la NR sur la serine-543. Deux d'entre elles sont révélées comme des protéines kinases à domaine à calmoduline (calmodulin-like domain protein kinases CDPKs), et une à domaine à SNF1 (SNF1-like protein kinase). La déphosphorylation de la serine-543 est catalysée par une protéine phosphatase  $Mg^{2+}$ -dépendante et par une protéine phosphatase type 2A (NR-PPs), qui est régulée par une inter-conversion trimer/dimer (Kaiser et al., 1999). Les NR-PKs, NR-PPs, et 14-3-3s sont présents même dans les tissus de plantes déficientes en NR.

L'activation artificielle de la NR in vivo est achevée par une acidification cellulaire, par des inhibiteurs respiratoires, ou par une alimentation en mannose. Comme pour l'anoxie, ces traitements semblent agir, au moins en partie, via une acidification cytosolique favorisée par des niveaux faibles d'ATP cytosolique (Kaiser et al., 1999). L'activation est aussi achevée par l'efflux de cations divalents du cytosol induit par l'ionophore. En addition, l'AMP cytosolique et les esters phosphates semblent réguler les activités NR-PK et NR-PP, par lesquelles l'activité de la NR s'adapte durant quelques minutes à un changement de l'environnement (Kaiser et al., 1999).

Athwal et al. (1998) reportent que les résidus serine et thréonine de la position +6 à +8, relatifs au site de fixation de la 14-3-3 connu dans l'inactivation de la NR phosphorylée impliquant la serine-543, sont importants dans l'interaction avec la GF14 $\omega$ , isoforme

recombiné de la 14-3-3 d'*Arabidopsis*. Ils montrent également qu'une augmentation de la force ionique avec le KCl ou le phosphate inorganique, effecteurs physiques de l'activité NR, perturbe directement la fixation de protéine et peptides ligands à la 14-3-3. Une augmentation de la force ionique par KCl cause un changement dans la conformation de GF14 $\omega$ , résultant d'une réduction de la surface d'hydrophobicité, visualisé avec une sonde fluorescente. Similairement, le 5'-AMP est spécifiquement capable de perturber le complexe inactif NR phosphorylée:14-3-3. Utilisant un analogue fluorescent du 5'-AMP (le trinitrophenyl-AMP), ces auteurs montrent qu'un site de fixation de l'AMP sur la GF14 $\omega$  existe probablement.

Dans une étude Agüera et al. (1999) trouvent que l'état d'activation de la NR des feuilles attachées de *Cucumis sativus* en présence de  $Mg^{2+}$ , relatif à l'activité en absence de  $Mg^{2+}$ , augmente avec une intensité lumineuse supérieure à 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR. L'activité NR de ces feuilles change rapidement d'une manière réversible durant le passage de la lumière à l'obscurité, particulièrement en présence de  $Mg^{2+}$  libre (Agüera et al. 1999). La lumière diminue et l'obscurité augmente la sensibilité de l'enzyme à l'inhibition par  $Mg^{2+}$ , impliquant que la NR a une régulation post-translationnelle commune par phosphorylation (Lillo et al., 1997; Agüera et al. 1999).

Quand l'extrait brut des feuilles illuminées est incubé avec l'ATP, la NR est graduellement inactivée en présence de  $Mg^{2+}$ . La NR inactivée par l'ATP reste inactive après élimination de l'excès d'ATP par filtration sur gel et ne se produit pas avec des préparations de la NR partiellement purifiées. Ces auteurs constatent aussi que la NR extraite de feuilles de plantes d'obscurité est remarquablement activée par le 5'-AMP (Agüera et al. 1999). Ces résultats supportent l'idée que l'inactivation/activation de la NR en réponse aux signaux de la lumière/obscurité impliquent plus probablement une phosphorylation/déphosphorylation de l'enzyme catalysée par des protéines endogènes. Une activation substantielle de la NR avec le 5'-AMP est observée aussi en absence de  $Mg^{2+}$ , indiquant que le 5'-AMP peut directement activer la NR (Agüera et al. 1999). L'irradiation d'un extrait de feuilles provenant de plantes d'obscurité contenant le FAD provoque une activation partielle de la NR. Cet effet est observé avec ou sans  $Mg^{2+}$ , indiquant que l'activation est causée par la flavine photoexcitée et n'implique pas une déphosphorylation de l'enzyme (Agüera et al. 1999).

La gelée réduit fortement l'activité de la NR des feuilles de blé par perturbation du transport des électrons au niveau de la région du hinge 1 de la NR (Yaneva et al., 1996; Vunkova-Radeva et Yaneva, 1997). Cet effet a été observé seulement chez des plantes de blé déficientes en molybdate (Mo). Il a été conclue que la déficience en Mo affecte non seulement

la disponibilité en Mo-co, mais aussi l'efficacité du transport des électrons entre les domaines à hème et à Mo-co de la NR. Le mécanisme par lequel le Mo empêche la diminution de l'activité de la NR à basse température est non claire. Des résultats récents de ces auteurs (Yaneva et al., 2000) indiquent que la déficience en Mo n'altère pas le "timing" des changements de l'activité NR durant un cycle lumière/obscurité mais, par contre, réduit significativement le niveau maximal de l'activité NR ( $ANR_{max}$ ) et l'activité actuelle de la NR ( $ANR_{act}$ ) et produit un état d'activation élevé de la NR.

Cette élévation de l'état d'activation de la NR est une réponse compensatoire à la diminution de l' $ANR_{max}$  comme a été trouvé par Man et al. (1999) chez des plantes déficientes en nitrate. Une telle réponse peut être importante pour assurer un niveau élevé en NR active (déphosphorylée) chez des plantes qui ont de faibles quantités de la protéine NR fonctionnelle. Du fait de la nécessité du Mo dans l'assemblage fonctionnel de la protéine NR, ces auteurs considèrent que l' $ANR_{max}$  serait contrôlée par la disponibilité en Mo et Mo-co, tandis que l' $ANR_{act}$  serait contrôlée par le Mo indirectement via l'altération du rapport NR phosphorylée/NR déphosphorylée. Cette dernière observation est supportée par le fait que l'effet du Mo sur l' $ANR_{act}$  disparaît presque totalement après une période d'obscurité prolongée (24 h) ou la forme phosphorylée de la NR prédomine, tandis que l'effet du Mo sur l' $ANR_{max}$  reste bien prononcé. Toutefois, ces auteurs suggèrent aussi que d'autres facteurs comme les glucides affectent probablement le niveau de l' $ANR_{act}$  chez les plantes déficientes en Mo du fait que les sucres (i) modulent l'activité NR au niveau post-translational et (ii) sont influencés par la déficience en Mo (Vunkova-Radeva et Yaneva, 1997).

La NR est rapidement inactivée par phosphorylation en réponse, par exemple, à une soudaine diminution de l'intensité lumineuse (Kaiser et Brendele-Behnisch, 1991; MacKintosh, 1992; Kojima et al., 1995). L'existence d'une étroite liaison entre la régulation de l'activité NR et le contrôle du métabolisme du carbone via un signal de transduction impliquant la phosphorylation de la NR et la 14-3-3 est un bon exemple de l'implication de ce mécanisme dans l'ajustement et l'intégration de la NR dans le métabolisme de la plante (Champigny et Foyer, 1992; Champigny, 1995; Huber et al., 1996; Moorhead et al., 1996).

En plus de ce mode de régulation par phosphorylation, un autre mécanisme de régulation post-translational de la NR a été suggéré, basé sur le fait que la NR de la courge (*Cucurbita maxima*) est lentement activée par son substrat, NADH (Lillo et Ruoff, 1992). Pour chercher s'il y a des connections entre ces deux modes de régulation Lillo et al. (1997) entreprennent une étude comparative d'espèces utilisant plus l'activation par substrats (*Cucurbita maxima*) que la phosphorylation/déphosphorylation (*Spinacea oleracea*) dans la

régulation de la NR. Ils trouvent que l'augmentation de l'activité NR durant l'essai ou durant le stockage de l'extrait brut peut être due à une dissociation du complexe NR phosphorylée:14-3-3, à une déphosphorylation de la NR phosphorylée par les phosphatases internes, ou à une activation par les substrats NADH et nitrate. Le mode d'activation dépend de l'espèce et des conditions d'incubation. L'activation par substrat chez la courge est évidente sur extrait brut comme a été trouvé chez le maïs (Lillo et Ruoff, 1992), mais elle est totale chez l'extrait partiellement purifié. Cependant, le tabac et l'épinard ne montrent pas ce mode d'activation. Il n'existe pas de connections entre l'activation par substrat et la NR phosphorylée extraite de plantes d'obscurité. Ces observations montrent que le mode de régulation par phosphorylation et fixation de la 14-3-3 serait une manière générale chez toutes les plantes. Quand celui-ci est important le mode d'activation par substrats est absent, mais quand il est faible, le mode d'activation par substrats le remplace comme chez la courge et le maïs (Lillo et Ruoff, 1992; Lillo et al., 1997).

Le domaine à Mo-co de la NR qui se trouve entre la queue N-terminale de la protéine NR et le résidu serine (qui se phosphoryle) a été suggéré jouer un rôle vital dans l'inactivation réversible de la NR par le mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation (LaBrie et Crawford, 1994; Nussaume et al., 1995; Douglas et al., 1995). Similairement, une délétion de 56 acides aminés du N-terminal abolit la régulation de la NR par phosphorylation quand elle est testée sur des extraits bruts (Nussaume et al., 1995). Presque aucune différences n'est obtenues quand la NR extraite des feuilles est exposée à la lumière et à l'obscurité. Au contraire des autres plantes, une incubation avec MgATP n'a plus d'effet inhibiteur sur l'activité NR de l'extrait brut. Ceci signifie que l'activité NR dans l'extrait brut des feuilles traitées par l'obscurité n'est plus inhibée par  $Mg^{2+}$ . Ce résultat est supposé être dû à une altération de la fixation de la 14-3-3 par la délétion (Douglas et al., 1995). En revanche, Lillo et al. (1997) trouvent que la NR altérée du tabac est inhibée par la 14-3-3. Quand la NR altérée est purifiée en présence d'inhibiteurs des phosphatases, 70% de l'activité NR est inhibé par la 14-3-3. Par contre, quand les inhibiteurs des phosphatases sont exclus, seulement 18% de l'activité NR est inhibé par la 14-3-3, indiquant que l'inhibition par la 14-3-3 est en effet dépendante de l'état de phosphorylation de la NR altérée comme de la longueur entière de NR. Ce résultat contredit l'hypothèse de Douglas et al. (1995) et montre que même après délétion, la NR peut être régulée par phosphorylation/déphosphorylation. Cependant, l'absence apparente d'une régulation post-translationnelle de NR, quand elle est testée immédiatement après homogénéisation de l'extrait brut, laisse supposer des différences dans la dissociation du complexe NR~14-3-3 et NR altérée~14-3-3 dues à des composés inconnus

initialement présents dans la plante avant extraction de la NR. Ceci indique que probablement la NR altérée est dépourvue de la 14-3-3 in situ, suggérant alors à ces auteurs des études sur la réactivation de l'activité NR altérée (Lillo et al., 1997).

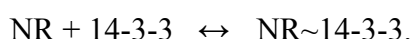
D'autre part, Pigaglio et al. (1999) observent que le motif acide du domaine N-terminal de NR est nécessaire pour l'inactivation de l'enzyme à l'obscurité par phosphorylation et fixation de la 14-3-3. Cependant, une délétion de ce domaine de la NR permet encore la fixation de la 14-3-3 mais affecte ces propriétés inhibitrices (Provan et al., 2000). Ces auteurs suggèrent alors que la stabilisation de l'activité NR est une importante fonction du domaine N-terminal de la NR. Ces observations sont en accord avec les résultats de Lillo (1994) qui suggèrent l'existence de deux formes différentes de la NR: une forme lumière avec un pH optimal de 7.8 qui n'est pas inhibée par le  $\text{Ca}^{2+}$  ou le  $\text{Mg}^{2+}$  et une forme obscurité avec un pH optimal de 7.5 qui est fortement inhibée par le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$ .

Une rapide modulation de l'activité NR durant le passage de la lumière à l'obscurité a été établit chez plusieurs plantes herbacées, incluant l'épinard (Kaiser et Spill, 1991), l'orge (Lillo et al., 1996), le maïs (Merlo et al., 1995), le tabac (Nussaume et al., 1995), et *Arabidopsis* (Su et al., 1996). Ces changements rapides de l'activité se produisent au niveau post-translational par une phosphorylation réversible de la protéine NR (Yaneva et al., 2000). Les résultats de Kaiser et Huber (1997) montrent que la forme phosphorylée de la NR est un bon substrat pour la dégradation protéolytique plus que la forme déphosphorylée. Ces observations sont en accord avec la grande susceptibilité de la NR phosphorylée à la protéolyse, qui est connue prédominer chez les plantes exposées à l'obscurité.

La phosphorylation serait une régulation rapide, transitoire et réversible, par contre, après une longue période d'obscurité, la stabilité de la protéine est très réduite, conduisant à une dégradation irréversible de l'enzyme (Fig. 8). Kandlbinder et al. (2000) trouvent que la sensibilité de la NR au  $\text{Mg}^{2+}$  chez *Ricinus communis* dépend fortement du pH (increasing sensitivity with increasing pH), et qu'au contraire de la NR d'épinard, la NR de *Ricinus* est à peine ou pas inactivée par incubation de l'extrait foliaire avec l'ATP et l'acide okadaïque inhibiteur de la protéine phosphatase catalysant la déphosphorylation de la NR. Similairement, la suppression de la 14-3-3 de l'extrait foliaire par chromatographie à échange d'anions active la NR de l'épinard mais cause peu ou pas d'activation de la NR de *Ricinus* (Kandlbinder et al., 2000). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la NR catalysée par  $\text{Mg}^{2+}$  chez *Ricinus* ne requière pas la 14-3-3. Les changements lents de l'activité de la NR chez cette espèce durant un cycle jour/nuit peuvent être causés principalement par la synthèse et la dégradation de la protéine NR (turnover) comme a été trouvé par Scheible et al. (1997) et

Maki et al. (1986). Ces derniers auteurs ont trouvé que la régulation de la NR de cellules d'épinard, qui dépend de l'âge de la culture, est réalisée plus par des changements du taux de la protéine NR que par l'activation/inactivation des protéines préexistantes.

L'assimilation du nitrate apparaît donc contrôlée par la lumière durant le développement de la plante via les phytochromes et les autres récepteurs de la lumière (voir page 62). Une fois la photosynthèse est opérationnelle, la lumière continue à réguler l'assimilation du nitrate de manière métabolique par le saccharose (source d'énergie, de pouvoir réducteur et chaînes carbonées) ou en modulant directement l'activité NR par phosphorylation. En fait, la régulation de la NR apparaît se faire par plusieurs mécanismes différents et variables avec l'espèce (phosphorylation et déphosphorylation, fixation et dissociation, activation par substrats, et synthèse et dégradation). Toutefois, plusieurs études restent à réaliser au niveau moléculaire pour bien élucider ces mécanismes de régulation, leur variabilité génétique, leur prépondérance ainsi que leur interaction. Il serait également important d'étudier (i) les interactions et les spécificités entre la protéine NR et la protéine 14-3-3, et (ii) la réaction:



## **V. 2. Le malate et le 2-oxoglutarate**

L'assimilation du nitrate dans les feuilles requière la synthèse du malate pour contre balancer l'alcalinisation. Elle nécessite aussi la synthèse du 2-oxoglutarate pour agir comme accepteur dans la voie GOGAT (Ben-Zioni et al., 1971; Touraine et al., 1988; Matt, et al., 2001). La transcription de la NR augmente durant la nuit et diminue durant le jour. L'activité NR augmente au maximum durant les quatre premières heures de la période d'éclairement et diminue durant la seconde partie de cette période (Müller et al., 2001). Le malate s'accumule à un niveau élevé durant le jour et diminue durant la nuit. Le 2-oxoglutarate augmente de 40% au début et diminue vers la fin de la journée. Le rapport glutamine/2-oxoglutarate est stable au début de la période d'éclairement et augmente remarquablement durant la seconde partie de cette période. Ces observations montrent que les variations diurnes de la transcription de la NR sont inversement corrélées aux variations diurnes du malate et n'ont, par contre, aucun rapport avec celles du 2-oxoglutarate ou du rapport glutamine/2-oxoglutarate (Müller et al., 2001). La diminution de l'activité NR dans la seconde partie de la période lumineuse est corrélée avec une augmentation du rapport glutamine/2-oxoglutarate.

Un apport de malate et de 2-oxoglutarate à des feuilles détachées via leur pétioles durant la seconde partie de la période d'éclairement, quand la transcription et l'activité de la NR sont faibles, provoque une diminution plus importante du taux de transcription de la NR



et une diminution de 27 à 60% de l'activité NR. Par contre, le 2-oxoglutarate stabilise le taux de transcription et a seulement un léger effet sur l'activité NR (Müller et al., 2001).

Dans une autre expérience, ces auteurs remarquent que le malate s'oppose à l'augmentation du taux de transcription de la NR et de l'activité NR, quand celui-ci est fournie pendant 4 h à la lumière à des feuilles issues de plantes préalablement maintenues 16 à 24 h à l'obscurité, tandis que le 2-oxoglutarate les accélère légèrement. D'autre part, quand des feuilles, préalablement maintenues 60 h à l'obscurité, sont incubées à l'obscurité sur du saccharose le malate inhibe fortement l'expression et l'activité NR (Müller et al., 2001). En conséquence, ces observations suggèrent que l'effet positif du malate sur l'absorption (Touraine et al., 1988; Abdellaoui, 2001) via une augmentation de l'influx ou une diminution de l'efflux est probablement un effet directe sur les systèmes de transport du nitrate et non un effet indirecte via la réduction du nitrate du fait que le malate affecte négativement la NR. D'autre part, la possibilité que cet effet positif sur l'absorption peut être plus dû à une stimulation du HATS et une ré absorption du nitrate efflué qu'à une diminution de l'activité du système de l'efflux par le malate reste aussi valable tant qu'un effet directe du malate sur l'efflux n'a pas été démontré.

Par ailleurs, le fait qu'un apport de malate à la partie aérienne ou aux racines n'arrive pas à empêcher la diminution de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  à l'obscurité chez le soja (voir page 39, Delhon et al., 1996a) contredit les observations de Touraine et al. (1988) et Abdellaoui (2001) et sont, par contre, en accord avec les résultats de Müller et al. (2001).

### **V. 3. Le rythme circadien**

L'ARNm de la NR varie au cours d'un cycle jour/nuit. Il est généralement élevé en fin de nuit (tabac et tomate) ou début de journée (maïs). La NiR fluctue d'une façon similaire mais avec de faible amplitude. Ces variations de l'ARNm sont suivies par des fluctuations décalées dans le temps de l'activité et de la quantité de protéines (Deng et al., 1991; Kaiser et Spill, 1991; Merlo et al., 1995; Nussaume et al., 1995; Su et al., 1996; Lillo et al., 1996; Yaneva et al., 2000; Matt et al., 2001). Ce rythme de la NR est régulé au niveau transcriptionnel. Il est indépendant de la régulation par la lumière car il peut être maintenu pendant plusieurs heures de lumière ou d'obscurité continue. Par contre, il semble dépendre de la concentration en glutamine (Fig. 3). Le niveau d'ARNm de la NR varie en sens opposé par rapport à la glutamine. En présence d'inhibiteurs spécifiques de la GS (méthionine sulfoximine) ou de la NR (tungstate) ou chez des mutants déficients en NR, les plantes traitées ont peu de glutamine et montrent une expression constitutive de l'ARNm de la NR.

#### V. 4. Les hormones

L'effet de plusieurs hormones a été étudié et plus spécialement celui des cytokinines sur l'expression de la NR. Chez certaines espèces, la présence d'éthylène est nécessaire pour l'induction de la NR par les cytokinines, mais l'éthylène seul n'a pas d'effet. Il a été aussi trouvé que les mécanismes d'induction de NR par le nitrate ou par les cytokinines sont distincts de leurs effets additifs. Par contre, chez le blé étiolé les cytokinines seules n'ont pas d'effet et nécessitent la présence du nitrate.

Chez des plantules d'orge étiolées, une application de cytokinines à la lumière conduit 15 min après à une augmentation du taux d'ARNm de la NR. Par contre, chez un double mutant de tabac transformé Klein et al. (2000) trouvent qu'au contraire du saccharose les cytokinines n'annulent pas la diminution du niveau de transcription du gène de NR après transfert de ces plantes à une obscurité continue malgré que les chloroplastes, site du métabolisme des cytokinines, accumulent plus de précurseurs et d'activité cytokinines oxydase à l'obscurité qu'à la lumière (Benková et al., 1999). Des études sur la transcription montrent que cet effet est partiellement de nature transcriptionnel, suggérant probablement l'existence d'autres effets post transcriptionnels pouvant affecter la stabilité de l'ARNm et l'induction de l'activité. L'expression de la NR semble être influencée par la valeur du rapport cytokinines/acide abscissique (Lu et al., 1992) du fait que l'induction de NR par les cytokinines peut être annulée par la fourniture d'acide abscissique (Fig. 8).

#### VI. Conclusion et objectifs

La présente revue bibliographique montre que les composantes de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$ : l'influx et l'efflux, qui sont soumis à des contrôles différents, sont distincts et indépendants. L'interaction de ces deux types de flux en relation avec les processus de l'assimilation, du stockage et de la translocation régit le devenir ultime du nitrate. L'existence de ces flux exige la synthèse et l'activation de plusieurs types de protéines de transport et de voies métaboliques complètes (enzymes et cofacteurs). Une bonne gestion de ces paramètres par la plante nécessite aussi une étroite régulation et interaction des mécanismes impliqués avec le métabolisme du carbone et des acides organiques au niveau biochimique, moléculaire et génétique. Une coordination inter-organes de ces mécanismes permettrait une synchronisation du prélèvement de l'azote avec la croissance et le développement du système racinaire et de la partie aérienne.

L'essentiel de l'information dont nous disposons provient de trois approches méthodologiques: (i) la description des flux à l'aide des isotopes  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{N}$  (ii) l'évaluation des systèmes de transport et (iii) le clonage des gènes de ces systèmes de transport.

La caractérisation et la quantification de l'influx et l'efflux du nitrate n'ont pu être abordés que par l'emploi des traceurs  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{N}$  (Lee et Clarkson, 1986; Lee et Drew, 1986; Oscarson et al., 1987; Muller et al., 1995; Vidmar et al., 2000).

Les propriétés cinétiques et les caractéristiques physico-chimiques des protéines impliquées dans le transport du nitrate sont maintenant bien étudiées (Doddema et Telkamp, 1979; Siddiqi et al., 1990; Aslam et al., 1992; Glass et al., 1992; Hoff et al., 1994; Crawford, 1995; Kronzucker et al., 1995, 1999a; Glass et Siddiqi, 1995; Wirén et al., 1997; Peuke et Jeschke, 1999; Chrispeels et al., 1999; Vidmar et al., 2000). Grâce à ces études de flux, couplées aux études moléculaires, plusieurs transporteurs membranaires des nitrates ont été découverts. Des résultats spectaculaires en génétique ont permis la découverte de deux familles de gènes: (i) NRT1 codant les systèmes de transport membranaire du nitrate de faible affinité (LATS) et (ii) NRT2 pour les systèmes à haute affinité (HATS) chez différentes espèces végétales (Tsay et al., 1993; Huang et al., 1996; Wang et Crawford, 1996; Wang et al., 1998; Zhou et al., 1998; Crawford et Glass, 1998; Daniel-Vedel et al., 1998; Huang et al., 1999; Liu et al., 1999; Lin et al., 2000; Vidmar et al., 2000). Toutefois, tant que la nature exacte du mécanisme impliqué dans l'influx et l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_3^-/\text{OH}^-$  ou  $\text{NO}_3^-/\text{HCO}_3^-$  antiport,  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  symport et canal) reste inconnue, les gènes et les types de régulation qui contribuent le plus dans l'acquisition du nitrate resteront mal compris et les hypothèses sur le mécanisme et la régulation des flux de nitrate entrant et sortant resteront nombreuses et diverses.

Il existe encore des lacunes considérables dans nos connaissances sur les mécanismes précis du processus de l'efflux, composante de l'absorption nette (Breteler et Nissen, 1982; Clarkson, 1986; Lee et Drew, 1986; Deane-drummond, 1986; Oscarson et al., 1987; Mattsson et al., 1991; Aslam et al., 1995; Ter Steege et al., 1999). Les systèmes et les canaux impliqués dans ce processus ainsi que leur contribution dans la régulation de l'absorption du nitrate sont encore très mal connus (Clarkson, 1986; Deane-drummond, 1986; Oscarson et al., 1987; Aslam et al., 1996b; Frachisse et al., 2000). L'existence d'une NR dans le plasmalemma et dans le cytosol (Rufty et al., 1986; Stöhr, 1999) ainsi que l'existence de connections entre la translocation et l'absorption du nitrate (Siebrecht et Tischner, 1999) et entre la translocation et l'efflux (Ter Steege et al., 1999) montrent que ces trois processus de base sont intimement liés. Cependant, on ne connaît pas avec précision sur quelle composante de l'absorption (l'influx et l'efflux), la NR et les protéines de la translocation sont principalement connectées. L'existence d'un gène de transport de  $\text{NO}_3^-$  dont l'expression est régulée par les produits de l'assimilation du nitrate et d'un autre gène dont l'expression est régulée par la NR active, qui module l'efflux, montre une complexité dans la régulation de l'absorption au niveau

moléculaire (Lejay et al., 1999; Vidmar et al., 2000). Il existe encore peu d'informations sur les mécanismes impliqués dans ces régulations. Elles nécessitent un surcroît d'études sur les mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes de l'influx et de l'efflux du nitrate ainsi que le mécanisme de l'efflux lui-même.

Nos connaissances sont encore fragmentaires et limitées dans la régulation de l'absorption par l'influx et l'efflux qui sont deux processus indépendants (Lee et Clarkson, 1986; Clarkson, 1986; Aslam et al., 1995). On ne sait pas parfaitement si l'effet des facteurs exogènes et endogènes ( $K^+$ ,  $NH_4^+$ , acide aminés, acide organique,...) sur l'absorption s'exerce plus sur l'influx ou sur l'efflux (Lee et Drew, 1989; Touraine et al., 1988, 1992; Muller et Touraine, 1992; King et al., 1993; Muller et al., 1995; Kronzucker et al., 1995, 1999b; **Partie I et chapitre 5**).

Du fait de leur méconnaissance, il serait aussi difficile de conclure quant au rôle joué par chacun d'eux dans la régulation de l'absorption nette. Certaines études confirment que l'efflux joue un rôle prépondérant (Breteler et Nissen, 1982; Glass et al., 1985) alors que d'autres suggèrent que ce rôle revient à l'influx (Lee et Drew, 1986; Mattsson et al., 1991). D'autres études suggèrent que les deux sont importants dans la régulation de l'absorption nette: l'influx à long terme par sa phase d'induction et l'efflux à court terme par ses rapides fluctuations (Clarkson, 1986).

Au Maroc, un des principaux empêchement de l'amélioration variétale pour les capacités de prélèvement et de stockage du nitrate est le manque d'études physiologiques pour un triage variétale simple et rapide au laboratoire. L'intérêt croissant suscité par ce manque d'informations a conduit notre laboratoire à orienter une partie de ces recherches vers ces mécanismes d'acquisition du nitrate car la maîtrise de l'amélioration et de la sélection variétale pour une meilleure performance de prélèvement et de stockage du nitrate passe par la maîtrise des connaissances sur les mécanismes d'absorption, d'assimilation, d'accumulation et de translocation du nitrate et leur régulation.

Par ailleurs, la plupart des recherches appliquées effectuées à ce jour renforcent l'idée que l'application rationnelle de fertilisant en vue d'améliorer la production agricole passe par l'introduction d'un matériel végétal biologiquement et/ou génétiquement performant (Ryan et al., 1994; Karrou, 1992, 1996; Ehdaie et al., 1999). Au Maroc, Il existe un réservoir inexploré de variétés de céréales, souvent mal connues sur le plan physiologique. Une bonne utilisation de ce potentiel exige, d'une part la mise en œuvre d'un très grand nombre d'essais et d'observations de terrain et, d'autre part une meilleure connaissance des capacités physiologiques et agronomiques des génotypes.

Pour toutes ces raisons, j'ai essayé par le présent travail, d'une part d'améliorer nos connaissances sur le métabolisme du nitrate et son intégration dans le métabolisme du carbone et sur les processus de régulation de l'efflux des nitrates et des sucres et, d'autre part d'apporter des informations sur des variétés marocaines de blé tendre. Les points qui ont donc retenus mon attention sont:

- la croissance de la partie aérienne (**chapitre 1**),
- la constitution azotée et carbonée de la plantule de blé (**chapitres 2 et 3**),
- l'absorption et la réduction des nitrates (**chapitre 3**),
- l'effet des sels et de l'eau sur l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  (**chapitres 4 et 5**),
- l'effet de  $\text{NO}_3^-$  sur l'efflux des nitrates et des glucides (**chapitre 6**),
- la régulation de l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  par la racine et la partie aérienne (**chapitre 7**),
- la régulation de l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  par les feuilles matures (**chapitre 8**).

## **PARTIE II**

### **RESULTATS ET DISCUSSION**

# CHAPITRE 1

**Analyse comparative de paramètres morphophysiologiques au stade jeune  
de quatre géotypes marocains de blé tendre (*Triticum aestivum* L. var.  
Achtar, Saâda, Saba et Tegyey<sup>32</sup>)**

Mohammed BenDriss Amraoui, Asmae Malali, et Ahmed Talouizte

Laboratoire de Physiologie végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences Dhar el

Mehraz B.P. 1796, Atlas, Fès, Maroc.

Les résultats de ce chapitre sont présentés tels qu'ils ont été publiés dans Actes J. Sc. sur le  
Blé 1998 Oujda, Maroc, pp. 66-73.



### Résumé

La croissance, les teneurs en chlorophylles, l'état hydrique, la transpiration ont été étudiés chez quatre variétés marocaines de blé tendre (*Triticum aestivum* L. var. Achtar, Saâda, Saba, Tegye32) au stade jeune. L'examen des résultats relatifs à la croissance permet de distinguer les variétés Saâda, Saba et Tegye32 de la variété Achtar par une elongation foliaire plus importante au niveau de toutes les feuilles durant 21 jours de culture. En revanche, la variété Achtar semble posséder une surface foliaire similaire à celle de la variété Saba et élevée par rapport à celles des variétés Saâda et Tegye32 au stade 21 jours. Les variétés Saâda et Tegye32 présentent des surfaces foliaires similaires. La variété Saba se caractérise des autres variétés à la fois par une importante elongation foliaire semblable à celles de Saâda et Tegye32 et par une surface foliaire plus élevée que celles de Saâda et Tegye32 au stade 21 jours. Les teneurs en chlorophylles et l'état hydrique des quatre génotypes sont similaires. Ces variétés présentent toutes en général un faible déficit de saturation de 4%. Toutefois la variété Tegye32 semble présenter une vitesse de transpiration élevée par rapport aux autres variétés.

**Mots clés:** elongation foliaire; surface foliaire; chlorophylles; état hydrique; transpiration; génotypes

### Introduction

Près d'un milliard de tonnes de céréales sont produites annuellement dans le monde. Le blé et le riz sont les plus importantes. Malgré la place importante qu'occupe la culture du blé dans notre agriculture, le Maroc constitue un client potentiel pour le marché mondial des céréales. Sa culture située essentiellement en zone pluviale (non irriguée) est limitée par une mauvaise distribution des pluies et un déficit hydrique au cours du cycle végétatif. Certes, depuis longtemps la création de variétés productives et résistantes à la sécheresse est devenue une des préoccupations majeures des sélectionneurs.

Pour ces raisons, divers paramètres morphologiques et physiologiques des parties aériennes liés au rendement tels que: la durée de la surface foliaire (Thorne, 1974), la production de talle et d'épis (Klepper et al., 1982), la production de matière sèche (McMullan et al., 1988), le taux d'apparition des feuilles (Cao et Moss, 1989), la production des réserves végétatives (Garcia et al., 1993), ont été étudiés à différents stades de développement du végétal. Ces recherches axées essentiellement sur la physiologie de la production en grain dans les zones sèches et chaudes donnent peu d'importance à la période de pré-tallage. Cependant, une connaissance plus approfondie du modèle du développement des variétés depuis leur jeune âge pourrait aider à mieux connaître les génotypes et à définir des critères efficaces, simples et prédictifs de sélection variétale.

Dans ce travail sont présentés les résultats de l'étude de la croissance et développement de quatre génotypes marocains de blé tendre jusqu'au stade 21 jours sous de bonnes conditions hydriques et nutritionnelles contrôlées.

## Matériels et méthodes

### Matériel végétal et culture

Des semences de quatre variétés: Achtar, Saâda, Saba et Tegye<sup>32</sup> fournies par SONACOS FES sont désinfectées par l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 3 min, rincées soigneusement plusieurs fois, puis mises à imbiber 8 heures dans de l'eau distillée. Les graines imbibées sont réparties sur une gaze humide portée par un cerceau en plastique. L'ensemble est trempé dans une bassine d'eau distillée de sorte que les extrémités de la gaze baignent dans l'eau distillée. La bassine est couverte pour assurer une ambiance humide et obscure. Après 6 jours dans ces conditions à température ambiante, 25 plantules homogènes sont repiquées en pots de 5 L de solution nutritive (Coïc, 1977) contenant 1 mg de Fe<sup>3+</sup>-EDTA/L de milieu et des oligo-éléments de la solution d'Arnon A5 (Talouizte et al., 1984). L'azote est fourni exclusivement sous forme de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> à raison de 8 mM. Ce milieu est constamment aéré et renouvelé régulièrement deux fois par semaine. Les plantes sont élevées dans une chambre de culture à un éclairage artificiel de 400 µmol de photons/m<sup>2</sup>/s (PAR 400-700 nm), avec une photopériode de 16 h, une humidité relative de 65% et une température de 24 ± 2°C le jour et 18 ± 1°C la nuit.

### Mesure de la croissance

Après repiquage des plantules sur pot (7<sup>e</sup> jours), dix plantules homogènes de chaque variété sont repérées sur le pot de culture. La croissance est suivie quotidiennement par la mesure de la longueur de chaque feuille le matin, 3 h après le démarrage de la photopériode, pendant 21 jours.

### Extraction et dosage des chlorophylles

Après 21 jours de culture, la partie aérienne de trois plantules est pesée et broyée au mortier dans l'acétone à 100%. L'extrait obtenu est centrifugé à 3000 g à 0 °C pendant 20 min. Le surnageant est récupéré et le culot est centrifugé après être remis en suspension dans l'acétone. L'opération est répétée une troisième fois et les surnageants sont rassemblés et stockés à 4 °C. Les chlorophylles sont dosées par spectrophotométrie dans le surnageant, dilué à 80 % en acétone, à 645, 652 et 663 nm. La concentration de chlorophylles en mg/l du surnageant est calculée selon les formules suivantes de MacKinney (1941) complétées par Bruinsma à 80 % d'acétone:

$$[\text{Chl a}] = 12.7 \text{ DO}_{663} - 2.69 \text{ DO}_{645}$$

$$[\text{Chl b}] = 22.9 \text{ DO}_{645} - 2.68 \text{ DO}_{663}$$

$$[\text{Chl a+b}] = 27.8 \text{ DO}_{652}$$

### **L'état hydrique**

L'évaluation de l'état hydrique de la plante au stade 21 jours est suivie par quatre indicateurs: la teneur en eau par rapport à la matière fraîche, la teneur en eau par rapport à la matière sèche, la teneur en eau relative (RWC) et le déficit de saturation. Sur chaque feuille de cinq plantules, des fragments intermédiaires sont prélevés et découpés en tranche de 1 cm. Ces parties de feuilles fraîches sont pesées (MF) puis mises dans des récipients contenant 100 ml d'eau distillée durant 4 heures à l'abri de la lumière et à température ambiante. Elles sont repesées après un essuyage soigneux pour déterminer la masse fraîche à saturation (MFs). La masse sèche (MS) est déterminée après passage dans une étuve pendant 48 heures à 70°C. Ces différents paramètres sont estimés comme suit:

$$\text{Teneur en eau en \% de MF} = (\text{MF} - \text{MS}) / \text{MF} \times 100$$

$$\text{Teneur en eau en \% de MS} = (\text{MF} - \text{MS}) / \text{MS} \times 100$$

$$\text{Teneur en eau relative (RWC \%)} = ((\text{MF} - \text{MS}) / (\text{MFs} - \text{MS})) \times 100$$

$$\text{Déficit de saturation} = 100 - \text{RWC}$$

### **Mesure de la transpiration**

Au stade 21 jours les racines de quatre plantules intactes et homogènes sont trempées en solution nutritive dans un récipient. Au niveau du collet des plantules, le récipient est fermé hermétiquement avec un bouchon en caoutchouc permettant aux parties aériennes de rester à l'air libre tout en laissant les racines bien immergées dans la solution. Ce système plante-récipient est placé en chambre de culture et pesé à différents moments (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h ). La quantité d'eau transpirée par les feuilles est estimée par différence de poids entre le temps initial et le temps final. Après la dernière pesée, la partie aérienne est séparée des racines. La surface foliaire totale des quatre plantules est déterminée en comparant le poids d'une surface connue de papier au poids de l'image de la surface foliaire sur le même type de papier.

## Résultats et discussion

### Croissance des plantules

La croissance estimée par la mesure de la longueur des différentes feuilles de la partie aérienne présente une allure globale similaire chez les quatre variétés au cours d'une période de 21 jours. Un exemple de cette allure de croissance est donnée dans la Figure 1 par la variété Tegye32. L'élongation foliaire croît régulièrement à une vitesse relativement constante (Tab. 1). Cette vitesse chute jusqu'à s'annuler quand les feuilles ont atteint une élongation optimale marquant le passage de ces feuilles au stade mature (Fig. 1). Un à quatre jours après l'apparition de la feuille de rang  $n+1$ , la feuille de rang  $n$  entre en phase de maturation (Fig. 1) et la feuille de rang  $n+2$  apparaît bien développée avec une longueur appréciable. La croissance de la feuille de rang  $n$  est-elle limitée par le rythme d'apparition des feuilles de rang  $n+1$  et rang  $n+2$ . Cependant on peut se demander aussi si cet arrêt de croissance est d'origine trophique ou hormonale ou les deux à la fois.

La croissance foliaire comparée des quatre variétés est représentée dans la Figure 2. A partir de l'imbibition des graines, on constate que chez les quatre variétés la  $F_1$  nécessite environ 10 à 11 jours pour atteindre le stade mature, tandis que la  $F_2$  nécessite 15 à 16 jours (Fig. 2). Au stade 12 à 14 jours, il est important de rappeler que les réserves de la graine sont complètement épuisées et les besoins en photosynthétats pour les organes en croissance (racines et jeunes feuilles) sont assurés par la  $F_1$  déjà adulte et en partie par la seconde feuille qui tend vers le stade mature (Champigny et Talouizte, 1981). La  $F_3$  apparaît à des moments différents, au 12<sup>e</sup> jour chez Saâda et Tegye32, au 13<sup>e</sup> jour chez Achtar et Saba, et atteint sa maturité au 19<sup>e</sup> jour chez Tegye32, au 20<sup>e</sup> jour chez Saâda tandis qu'elle est encore en croissance chez Achtar et Saba. La  $F_2$  des quatre variétés apparaît au même jour (9<sup>e</sup> jour) tandis que la  $F_3$  apparaît environ 24 h plutôt chez Saâda et Tegye32 que chez Achtar et Saba. Ce décalage dans l'apparition des feuilles semble varier d'un rang foliaire à un autre. En effet ce décalage s'annule entre Saâda et Saba pour la  $F_4$  et s'accentue entre Achtar et Tegye32 jusqu'à atteindre 48 h. Ce résultat montre une précocité dans l'apparition des feuilles de rang 3 et 4 chez la variété Tegye32 et de la feuille de rang 3 chez la variété Saâda par rapport à Achtar et Saba.

En comparant la croissance des feuilles des quatre génotypes il semble que les variétés Saâda, Saba et Tegye32 se distinguent de la variété Achtar par une élongation foliaire remarquablement importante. Cependant, il est important de noter que cet écart de

croissance existe et persiste pour la F1 et la F2 aux stades de croissance et de maturité, tandis que pour la F3 (et peut-être pour la F4), l'ampleur de cet écart est plus faible au stade adulte (Fig. 2). La diminution de la longueur de la F1 et la F2 chez Achtar peut-être expliquée par la présence dans les tissus de ces feuilles de cellules moins allongées (Beauchamp et Lathwell, 1966). Cependant la supériorité des variétés Saâda, Saba et Tegye<sup>32</sup> par rapport à Achtar quant à l'élongation foliaire n'implique pas une croissance moins importante chez Achtar puisqu'au cours de la phase de croissance les quatre variétés présentent des vitesses de croissance sensiblement similaires (Tab. 1).

Au stade 3 semaines (21 jours) on constate chez toutes les variétés que la longueur finale du limbe augmente lorsque le rang foliaire augmente. Cependant ces différentes feuilles possèdent-elles des surfaces de plus en plus grande lorsque le rang foliaire augmente? Pour répondre à cette question, nous avons mesuré la surface du limbe des différentes feuilles des quatre variétés. Le Tableau 2 donne les surfaces foliaires des différentes feuilles des variétés étudiées au stade 21 jours. Les résultats de l'estimation de la surface foliaire montrent que la surface foliaire augmente lorsque le rang foliaire augmente (Tab. 2) jusqu'à au moins stade 3 feuilles. Il semblerait donc que la surface foliaire suit principalement les variations de l'élongation foliaire.

L'analyse des surfaces foliaires moyennes (Tab. 2) des quatre variétés montre une supériorité des variétés Achtar et Saba sur les autres variétés Saâda et Tegye<sup>32</sup>. Au contraire, les valeurs de la croissance foliaire estimée par la variation de l'élongation foliaire montrent une supériorité de Saâda, Saba et Tegye<sup>32</sup> par rapport à Achtar. Ce retard dans la croissance d'Achtar par rapport aux autres variétés quant à l'élongation foliaire semble être compensé par une augmentation progressive de la surface foliaire d'un rang foliaire à un autre et particulièrement au niveau de la F3 (Tab. 2).

#### **Teneurs en chlorophylles**

La teneur en chlorophylle a chez les quatre variétés est supérieure à celle de la chlorophylle b (Tab. 3). Les teneurs en chlorophylles a, b et a + b sont similaires chez les quatre variétés (Tab. 3). L'estimation de la teneur en chlorophylles dans nos conditions ne permet pas de distinguer les variétés entre elles. Toutefois, ces teneurs en chlorophylles sont l'indice d'un bon état phytosanitaire de nos plantules.

#### **L'état hydrique**

L'état hydrique estimé par la détermination des teneurs en eau par rapport à la matière fraîche et sèche, de la teneur en eau relative (RWC) et du déficit de saturation figure dans les

tableaux 4 et 5. En général les teneurs en eau par rapport à la matière végétale (matière fraîche, matière sèche) sont pratiquement similaires chez les quatre variétés. Ces teneurs atteignent une valeur allant de 88,6 à 91,8% de matière fraîche et de 779 à 1119% de matière sèche (Tab. 4). Ceci démontre l'importance de la fraction hydrique au sein d'un tissu végétal. Cependant il est important de remarquer que les valeurs de ces différents paramètres sont similaires et élevées chez les feuilles adultes (F1, F2 et F3 ) par rapport à la jeune feuille encore en pleine croissance (F4) et en particulier celles de la teneur en eau par rapport à la matière sèche (Tab. 4). Cette diminution de la teneur en eau par rapport à la matière sèche chez la F4 est due probablement à une transpiration accrue de cette feuille. Cet accroissement de la transpiration serait en faveur d'un flux de sève plus important vers cet organe. Les quatre variétés présentent des RWC supérieures à 92% indépendamment du rang foliaire, indiquant d'excellente condition d'hydratation de nos plantules élevées en aquiculture (Tab. 5). Dans la nature et même dans des conditions hydroponiques, les feuilles ne sont jamais saturées d'eau. Ces feuilles présentent toujours un léger déficit de saturation qui avoisine les 4% bien que les plantes aient leurs racines trempées dans la solution nutritive (Tab. 5). Ce léger déficit résulte probablement du processus de transpiration.

Ces résultats donnent les valeurs de grandeur de RWC en absence d'un stress quelconque. Il est important de noter que les différentes variétés présentent des RWC des parties aériennes similaires, en conséquence ces résultats ne permettent pas de dégager des différences variétales dans les mêmes conditions de culture.

Au stade 3 semaines (21 jours) on constate chez toutes les variétés un léger déficit de saturation similaire et des surfaces foliaires différentes. Cependant ces variétés présentent-elles aussi une similitude dans leurs vitesses de transpiration malgré qu'elles possèdent des surfaces foliaires différentes? Pour répondre à cette question des mesures de transpiration ont été réalisées. L'examen du Tableau 6 montre des vitesses de transpiration similaires chez Achtar, Saâda et Saba bien que les surfaces foliaires d'Achtar et Saba soient plus élevées que celles de Saâda (Tabx. 2 et 6). Ce résultat laisse supposer que les variétés Achtar et Saba perdent plus d'eau que la variété Saâda au cours du processus de transpiration.

Par ailleurs, la variété Tegye32 semble transpirer plus intensément que les autres variétés (Tab. 6). Comparée aux variétés Achtar, Saâda et Saba, la variété Tegye32 perd plus d'eau au cours de la transpiration malgré qu'elles présentent toutes un léger déficit de saturation similaire. Ce résultat suppose une absorption d'eau plus importante par cette variété par rapport aux variétés Achtar, Saâda et Saba.

Ce comportement hydrique (RWC,.....) des différentes variétés sera-t-il maintenu dans des conditions de déficit hydrique d'une part et dans des conditions atmosphériques différentes d'autre part (déficit de saturation de l'air)? La nutrition azotée a-t-elle une influence sur le comportement dans ces conditions? Dans des situations de contraintes hydriques on envisagera également une caractérisation plus précise de l'état hydrique des plantules par la mesure du potentiel hydrique.



### Conclusion

Le suivi de l'élongation foliaire chez les quatre variétés pendant 21 jours souligne une différence remarquable entre Achtar et les autres variétés au niveau de la croissance et en particulier chez les feuilles de rang 1 et 2, tandis qu'au niveau de la feuille de rang 3, l'écart entre Achtar et les variétés Saâda et Tegye32 diminue.

Par ailleurs, la supériorité des variétés Saâda, Saba et Tegye32 par rapport à Achtar quant à l'élongation foliaire n'implique pas une croissance moins importante chez Achtar puisque cette variété présente au stade 21 jours une surface foliaire similaire à celle de Saba et plus élevée que celle de Saâda et Tegye32 particulièrement au niveau de la F3. Il semblerait donc que le critère surface foliaire est aussi important que le critère élongation puisqu'il permet une seconde caractérisation de nos variétés. L'important dans l'analyse de ces courbes de croissance est d'être prudent dans l'utilisation et le choix des critères de croissance lorsqu'on souhaite établir des tests de précocité ou autres objectifs facilement utilisables par l'agriculteur ou l'expérimentateur. L'utilisation de la surface foliaire comme un critère d'évaluation de la croissance est en effet préférable à l'élongation du fait que c'est un paramètre à deux variables mais à lui seul il est insuffisant pour une meilleure caractérisation des variétés. Son utilisation serait d'une importance capitale dans la recherche de l'amélioration variétale dans la mesure où sa variation est suivie en parallèle avec celle de l'élongation foliaire depuis le stade graine jusqu'au stade tallage, au moins, sans destruction du végétal.

Les teneurs en chlorophylles ne permettent pas de différencier les quatre variétés. De même l'état hydrique des plantules de 21 jours en condition d'une bonne hydratation ne varie pas significativement d'une variété à une autre. Toutefois Tegye32 semble se distinguer par une transpiration plus intense qui serait accompagnée d'une absorption d'eau plus importante.

### Références bibliographiques

- Beauchamp, E. G., Lathwell, D. J. 1966. Effect of root zone temperature on corn leaf morphology. *Can J. Plant Sci.* 46, 593-601.
- Cao, W., Moss, D. N. 1989. Temperature effect on leaf emergence and phyllochron in wheat and barley. *Crop Sci.* 29, 1018-1021.
- Champigny, M. L., Talouizte, A. 1981. Photosynthates distribution and metabolic fate in relation to nitrogen metabolism in wheat seedlings. In: Akoyunoglou, G., (Ed.), *Photosynthesis IV. Regulation of carbon metabolism*. Balaban International Science Services, Philadelphia, pp. 645-652.
- Coïc, Y. 1977. Le problème des fertilisants azotés en agriculture et en horticulture. *C. R. Acad. Agr. de France* 63, 715-730.
- Garcia, D. M., Ramos, J. M. 1993. Identification des paramètres morphophysiologiques d'adaptation aux contraintes environnementales. Adaptation de l'orge dans le sud de l'Espagne. In: INRA Paris (Ed.), *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale*. Montpellier, France, 15-17 décembre 1992. (Les colloques, n° 64).
- Klepper, B., Rikman, R. W., Peterson, C. M. 1982. Quantitative characterisation of vegetative development in small grains cereal. *Agron. Journal* 74, 789-792.
- MacKinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140, 315-322.
- McMullan, P. M., Mcvertty, P. B. E., Urquhart, A. A. 1988. Dry matter and nitrogen accumulation and redistribution and their relationship to grain yield and grain protein in wheat. *Can. J. Plant Sci.* 68, 311-322.
- Talouizte, A., Guiraud, G., Moyse, A., Marol, C., Champigny, M. L. 1984. Effect of previous nitrate deprivation on <sup>15</sup>N-nitrate absorption and assimilation by wheat seedlings. *J. Plant Physiol.* 116, 113-122.
- Thorne, G. N. 1974. Physiology of grain yield of wheat and barley. Rothamsted Exp. Stn. Report for 1973, part 25-25.

## **CHAPITRE 2**

**Etude du métabolisme des nitrates chez quatre génotypes marocains de blé tendre (*Triticum aestivum* L. var. Achtar, Saâda, Saba et Tegyey<sup>32</sup>)**

Mohammed BenDriss Amraoui, Asmae Malali, et Ahmed Talouizte

Laboratoire de Physiologie végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences Dhar el

Mehraz B.P. 1796, Atlas, Fès, Maroc.

Les résultats de ce chapitre sont présentés tels qu'ils ont été publiés dans Actes J. Sc. sur le Blé 1998 Oujda, Maroc, pp. 92-96.

### Résumé

La nutrition azotée a été étudiée chez quatre variétés marocaines de blé tendre (*Triticum aestivum* L. var. Achtar, Saâda, Saba et Tegye32). L'azote organique soluble et insoluble des racines séparées des parties aériennes de jeunes plantules de blé à un stade précoce du développement (21 jours) ont été analysés. L'examen des résultats montre que le modèle de répartition de l'azote organique entre la forme soluble et insoluble des feuilles et des racines est similaire chez les variétés Achtar, Saâda, et Tegye32, et permet de distinguer la variété Saba des autres variétés par un modèle de répartition différent de l'azote organique entre la forme soluble et la forme insoluble. Ce modèle montre chez Saba une protidogenèse foliaire accrue par rapport aux racines au stade 3 à 4 feuilles.

**Mots clés:** nitrate; azote organique soluble et insoluble; blé tendre

## **Introduction**

Au Maroc, le problème d'autosuffisance en céréales se pose toujours malgré les progrès enregistrés dans ce domaine (Hammami, 1986; Besri, 1989). La recherche de l'amélioration du rendement des cultures nécessite des études approfondies des facteurs qui contrôlent la production végétale. L'effet bénéfique d'une fertilisation azotée et nitrrique en particulier sur le rendement des céréales est connu depuis longtemps. Les mécanismes précis d'acquisition et de gestion des nitrates par les plantes en général sont encore très mal connus (Lewis et al., 1982; Clarkson, 1986; Talouizte et al., 1990). La nécessité d'améliorer le rendement, les coûts élevés des engrais en général et azotés en particulier imposent la pratique d'une fertilisation raisonnée basée sur la connaissance des besoins des plantes en minéraux du sol.

L'objectif de cette étude est de comparer des génotypes marocains de blé tendre vis à vis du métabolisme des nitrates. Cette étude est réalisé avec des plantules intactes à un stade précoce du développement (3 à 4 feuilles) et cultivées en milieu hydroponique sur solution nutritive de composition définie et en conditions contrôlées. L'hydroponie est d'une importance capitale dans le contrôle de la nutrition minérale des plantes lorsqu'on vise la comparaison du comportement physiologique des différentes variétés étudiées. L'étude du métabolisme des nitrates est réalisé par l'examen des différentes formes de l'azote organique dans les différents organes de la plantule séparés les uns des autres (feuilles et racines).

## Matériels et méthodes

### Matériel végétal et culture

Des semences de quatre variétés marocaines de blé tendre: Achtar, Saâda, Saba et Tegye32 fournies par SONACOS FES sont désinfectées à l'hypochlorite de sodium, rincées soigneusement plusieurs fois, puis mises à imbiber pendant 8 heures dans de l'eau distillée. Les graines imbibées sont réparties sur une gaze humide portée par un cerceau en plastique. L'ensemble est trempé dans une bassine d'eau distillée de sorte que les extrémités de la gaze baignent dans l'eau distillée. La cuvette est couverte pour assurer une ambiance humide et obscure. Après 6 jours dans ces conditions à température ambiante, 25 plantules homogènes sont repiquées en pot de 5 L de solution nutritive (Coïc, 1977) contenant 1 mg de  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/L de milieu et des oligo-éléments de la solution d'Arnon A5 (Talouizte et al., 1984). L'azote est fourni exclusivement sous forme  $\text{NO}_3^-$  à raison de 8 mM. Ce milieu est constamment aéré et renouvelé régulièrement deux fois par semaine. Les plantules sont élevées ainsi dans une chambre de culture contrôlée à un éclairage artificiel de 400  $\mu\text{moles photons/m}^2/\text{s}$ , avec une photopériode de 16 h, une humidité relative de 65% et à une température de 24°C le jour et 18°C la nuit.

### Extraction et dosages de l'azote

Après détermination de la matière sèche, les parties aériennes et les racines sont broyées dans un mélange méthanol-chloroforme-eau distillée (12V/5V/3V) selon la méthode de Dickson (1979). L'azote soluble (surnageant) et l'azote insoluble (culot) sont déterminés par la méthode de Kjeldhal. L'ammonium est dosé par le réactif de Nessler (Umbreit et al., 1959).

## Résultats

Les masses de matière sèche (MS) des racines, des feuilles et de la plante entière des quatre variétés au stade 21 jours sont présentées dans le Tableau 1. La contribution des racines et des feuilles en terme de % de la plante entière figure aussi dans ce Tableau. L'examen des résultats montre une dominance en matière végétale des parties aériennes sur le système racinaire. En effet, les racines constituent seulement 24 à 27% de la plante entière. Les feuilles représentent 73 à 76% de la plante entière (Tab. 1).

Les déterminations d'azote organique effectuées sur ces plantes au stade 21 jours montrent que l'azote organique total de la plante est essentiellement protidique sous forme insoluble (72 à 86% de l'azote total, Tab. 2). L'azote organique soluble représente 14 à 28% de l'azote organique total de la plante (Tab. 2 ).

La répartition de l'azote organique entre la partie racinaire et la partie aérienne est représentée dans le Tableau 3. Les résultats montrent que l'azote organique total des jeunes plantules de blé tendre se répartie entre 20 à 22% dans les racines et 78 à 80% dans la partie aérienne (Tab. 3). Dans les racines, l'analyse des différentes formes de l'azote organique total montre que 23 à 28% est sous forme soluble et 72 à 77% sous forme insoluble (Tab. 4 ).

Dans la partie aérienne 11 à 28% de l'azote organique total est sous forme soluble tandis que la fraction d'azote organique insoluble varie entre 72 à 89% (Tab. 5 ).



## Discussion et conclusion

La comparaison inter-variétale des résultats relatifs à l'azote organique montre que Saba se distingue des trois autres variétés par le modèle de répartition de l'azote organique entre la forme soluble (faible: 14%) et la forme insoluble (élevée: 85%, Tab. 2). Ce résultat suggère chez Saba, contrairement aux trois autres variétés, l'existence d'un détournement de l'azote organique soluble au profit de l'azote organique insoluble (Protidogenèse favorisée ?).

Ce détournement accru de l'azote organique soluble au profit de l'azote organique insoluble chez Saba s'observe-t-il au niveau du système racinaire ou plutôt dans la partie aérienne de la plante ou dans les deux parties à la fois ? Les résultats présentés dans le Tableau 4 montrent que le modèle de répartition de l'azote organique entre la forme soluble et insoluble dans les racines de Saba ne diffère pas de celui des autres variétés (Tab. 4). En revanche, ce modèle de répartition dans la partie aérienne de Saba diffère de celui des autres variétés (soluble: 11%, insoluble: 89%, Tab. 5). Les teneurs des différentes formes d'azote organique des racines et des parties aériennes des jeunes plantules de blé tendre sont présentées dans le Tableau 6. On constate que la variété Saba se distingue toujours des trois autres variétés par des teneurs en azote organique relativement faible (Tab. 6). Au niveau des feuilles, cette variété se distingue des autres variétés par des teneurs en azote total et surtout en azote soluble faibles (10,7% du N-total des feuilles, Tab. 6) montrant une protidosynthèse accrue au sein de cet organe.

On peut avancer l'hypothèse que la partie aérienne de Saba serait le siège d'une protidogenèse accrue par rapport au système racinaire au stade 3 à 4 feuilles contrairement aux autres variétés. En d'autres termes l'azote organique soluble dans les racines de Saba (28%) contribuerait à une protidogenèse accrue dans les feuilles (89%) au détriment de la protidogenèse au niveau des racines (72%). Cette protidogenèse foliaire accrue chez Saba est associée aux processus de transport accru de l'azote organique soluble des racines vers les feuilles (Tab. 4). Ce résultat montre que chez Saba, les parties aériennes dépendent en partie des racines dans la synthèse de leurs protides. Cette dépendance est traduite par une mobilisation de l'azote réduit soluble des racines vers les feuilles. Le fait que Saba présente une protidogenèse favorisée dans ces feuilles est certainement en liaison avec une croissance foliaire relativement importante. L'analyse de la croissance des quatre génotypes a montré que Saba est la seule de ces variétés qui se caractérise à la fois par: (1) une importante élévation foliaire au cours de son développement et (2) une surface foliaire élevée au stade

21 jours (BenDriss Amraoui et al., 1998). Cette particularité de Saba peut être expliquée par une importante activité des tissus méristématiques des jeunes feuilles de cette variété. En effet, selon Champigny et Talouizte (1981), l'activité méristématique des tissus de la base des feuilles receveurs détermine la force d'appel de la sève élaborée (glucides, acide aminés,.....).

En général, au cours du développement de la plante, une compétition entre l'accumulation des glucides et la synthèse des protides existe et se manifeste à l'égard de la glucogenèse (Champigny et al., 1985). De ce fait, l'accroissement de la synthèse de protides enregistré chez Saba précédemment est probablement l'indice d'une faible accumulation de glucides foliaire et/ou racinaire chez cette variété. Cependant, les résultats présentés dans le Tableau 4 suggèrent que les racines de Saba contribueraient à une protidogenèse accrue dans les feuilles au détriment de la protidogenèse racinaire. Cette constatation nous amène à croire que si une compétition entre la synthèse des protides et la synthèse des glucides a eu lieu dans les organes de cette variété, les racines de celle-ci devront présenter une faible accumulation des glucides.

L'existence d'un transport accru de l'azote organique soluble (N-réduit) des racines vers les feuilles chez Saba suppose que la réduction des nitrates racinaires est très importante par rapport aux parties aériennes de cette variété. En effet, certains auteurs (Pate et al., 1973) attribuent un transport xylémique accru de l'azote réduit soluble à la prépondérance de la réduction des nitrates dans les racines. Par ailleurs, d'autres chercheurs (Rufy et al., 1982) critiquent l'utilisation de ce critère comme indicateur d'une réduction accrue des nitrates par les racines du fait de l'origine inconnue de l'azote réduit exsudé vers les feuilles lequel pouvant provenir des réserves racinaires.

### Références bibliographiques

- BenDriss Amraoui, M., Malali, A., Talouizte, A. 1998. Analyse comparative de paramètres morphophysiologiques au stade jeune de quatre génotypes de blé tendre marocain (*Triticum aestivum* L.). In: El Mtili, N., (Ed.), Act. J. Sc. sur le Blé, Oujda, Maroc, pp. 66-73.
- Besri, M. 1989. Etat sanitaire des semences de blé et d'orge utilisés au Maroc. Actualité Scientifique. John Libbey Eurotext.
- Champigny, M. L., Talouizte, A. 1981. Photosynthates distribution and metabolic fate in relation to nitrogen metabolism in wheat seedlings. In: Akoyunoglou, G., (Ed.), Photosynthesis IV. Regulation of carbon metabolism. Balaban International Science Services, Philadelphia, pp. 645-652.
- Champigny, M. L., Guiraud, G., Soualmi-Boujemaa, K., Talouizte, A., Moyse, A. 1985. Le rôle des racines et des feuilles dans l'assimilation du nitrate: le cas de la jeune plante de blé. C. R. Acad. Agric. de France 71, 283-291.
- Coïc Y. 1977. Le problème des fertilisants azotés en agriculture et en horticulture. C.R. Acad. Agr. de France 63, 715-730.
- Clarkson, D. T. 1986. Regulation of the absorption and release of nitrate by plant cells : a review of current ideas and methodology. In: Lambers, H., Neeteson, J., Stulen, I., (Eds), Physiological, ecological and applied aspects of nitrogen metabolism in higher plants, Nijhoff, M., Dordrecht, pp. 3-27.
- Dickson, R. E. 1979. Analytical procedures for the sequential extraction of  $^{14}\text{C}$ -labeled constituents from leaves, bark, and wood of cotton wood plants. Physiol. Plant. 45, 480-488.
- Hammani, W. 1986. Commercialisation, transformation et utilisation des céréales au Maroc. Céréales et Produits céréaliers en méditerranéenne. Inst. Agr. Méditerranéen, Montpellier 67-69.
- Lewis, O. A. M., James, D. M., Hewitt, E. J. 1982. Nitrogen assimilation in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Mazurka) in response to nitrate and ammonium nutrition. Ann. Bot. 49, 39-49.
- Randhawa, S. S., Iwata, M. 1968. Effects of pH, calcium concentration and sources of nitrogen on growth and inorganic composition of citrus seedling in solution culture. J. Jap. Soc. Hortic. Sci. 37, 27-36.

- Talouizte, A., Guiraud, G., Moyse, A., Marol, C., Champigny, M. L. 1984. Effect of previous nitrate deprivation on  $^{15}\text{N}$ -nitrate absorption and assimilation by wheat seedlings. *J. Plant Physiol.* 116, 113-122.
- Talouizte, A., Moyse, A., Champigny, M. L. 1990. Bases physiologiques de la nutrition nitrique des végétaux supérieurs. II. Contrôle de l'absorption des ions nitriques. *Ann. Biol.* 29, 217-234.
- Umbreit, W. W., Burris, R. H., Stauffer, J. F. 1959. *Manometric techniques*, 4<sup>th</sup> Ed. Burgess, Publ. Comp. Mineapolis USA.
- Yokomizo, H., Ishihara, M. 1973. Studies on the mineral nutrition of fruit trees by sand and water culture. 1. Effect of the composition of nutrient solution on the growth of Satsuma mandarin trees. *Bull. Hortic. Res. Stn. (Japan) Ser. A (Hiratsuka)* 12, 29-77.

## **CHAPITRE 3**

## Absorption et assimilation des nitrates chez quatre géotypes marocains de blé tendre (*Triticum aestivum* L. var. Achtar, Saâda, Saba et Tegye32)

### Résumé

La capacité d'absorption et d'assimilation des nitrates et l'accumulation des nitrates et des glucides au stade 21 jours sont analysées chez quatre variétés marocaines de blé tendre: Achtar, Saâda, Saba et Tegye32. L'examen des résultats montre que l'accumulation des nitrates prédomine dans la partie aérienne comparée aux racines, indiquant un flux de nitrate accru des racines vers cette partie. Elle est importante chez Tegye32 comparée aux autres variétés. La répartition des sucres entre la forme soluble et insoluble dans les racines et dans la partie aérienne diffère d'une variété à une autre. Saba accumule plus de sucres insolubles dans les racines et la partie aérienne et plus de sucres solubles seulement dans la partie aérienne que Achtar, tandis que Saâda et Tegye32 accumulent des quantités intermédiaires. La faible proportion des sucres solubles notée dans les racines de Saba (soluble: 2.8% et insoluble: 97.2%) comparée aux autres variétés confirme la protidogenèse foliaire accrue détectée chez cette variété (**chapitre 2**). Par ailleurs, le fait que Achtar possède une teneur en azote réduit soluble semblable à celle de Saâda et Tegye32 et supérieure à celle de Saba, et présente dans sa partie aérienne les plus faibles teneurs en nitrates et en sucres solubles comparée aux autres variétés suggère l'existence d'une importante assimilation des nitrates chez cette variété. De plus, même si les quatre variétés absorbent des quantités légèrement différentes durant 8 h, la variété Achtar assimile nettement plus de nitrates que les autres variétés (estimée à partir de la formule suivante:  $(\text{NO}_3^-)_{\text{red}} = (\text{NO}_3^-)_{\text{ab}} + (\text{NO}_3^-)_{\text{i}} - (\text{NO}_3^-)_{\text{f}}$ ). Ensemble, ces faits suggèrent une importante assimilation des nitrates dans les feuilles et/ou dans les racines associée à un important transfert d'azote organique vers la partie aérienne chez la variété Achtar.

**Mots clés:** nitrate; sucre; N-réduit; absorption; réduction; variété de blé

## Introduction

La céréaliculture constitue la principale spéculation de l'agriculture marocaine puisqu'elle prédomine dans les deux tiers des exploitations. La culture du blé représente la majeure préoccupation de l'agriculteur du fait des besoins croissants de cette denrée alimentaire. La recherche de l'amélioration du rendement des cultures nécessitant des études approfondies de facteurs qui contrôlent la production végétale est devenue de ce fait obligatoire. Cependant, en dépit du progrès considérable réalisé dans ce domaine, dû pour une large part à l'amélioration génétique des variétés et à la mécanisation agricole ou encore à l'augmentation des intrants industriels (fertilisants et produits phytosanitaires), des recherches à propos de l'efficacité d'utilisation des  $\text{NO}_3^-$  essentiellement axées sur la physiologie de la croissance et de l'acquisition de l'azote chez différentes variétés de blé depuis leur jeune âge restent toujours une démarche d'une importance capitale si on veut tester les performances des nouvelles variétés créées par les sélectionneurs.

Par ailleurs, les recherches entreprises sur les variétés de céréales améliorées l'ont été dans le cadre des études des effets de certaines contraintes du milieu (sécheresse, carence azotée et salinité, Karou, 1992 et 1996; Karrou et Maranville, 1994; Tahri et al., 1998; Aouad et al., 1998; Abdellaoui et Talouizte, 2001) ou contraintes techniques (fertilisation déséquilibrée et/ou insuffisante, absence de désherbage et d'irrigation, Ryan et al., 1994; Benmalek, 1998; Bouaziz et Soudi, 1998). Ces différentes investigations concernant en général le rendement en grain ont aussi mis en évidence quelques-unes des caractéristiques de ces variétés, mais souvent fragmentaires, elles ne fournissent que peu d'indications sur la croissance et le développement et les formes d'accumulation de l'azote et du carbone dans ces variétés. Elles ne peuvent donc servir de référence à l'étude du métabolisme azoté et carboné des variétés retenues dans cette étude.

Il m'a donc semblé nécessaire, avant d'étudier la nutrition nitrique de quelques variétés marocaines, de compléter les données déjà acquises, par l'examen du métabolisme des nitrates et du carbone ainsi que l'absorption et l'assimilation des nitrates chez ces variétés en bonne conditions d'hydratation et nutrition nitrique.

Les données obtenues précédemment sur la croissance foliaire et l'état hydrique (**chapitre 1**) et sur le métabolisme du nitrate de ces variétés (**chapitre 2**) sont re-discutées avec les données de ce chapitre.

## Matériels et méthodes

### Matériel végétal et culture

Les quatre variétés marocaines de blé tendre: var. Achar, Saâda, Saba et Tegye<sup>32</sup> fournies par SONACOS FES sont cultivées dans les mêmes conditions précédemment décrites dans les chapitres 1 et 2.

### Préparation du matériel

Après 21 jours de culture, les plantules sont réparties sur éprouvette par lot de quatre. Les racines des quatre plantules (non rincées à l'eau distillée) sont incubées, à la lumière, dans une éprouvette contenant la même solution nutritive qui a servi à la culture, mais dans laquelle l'azote est fourni exclusivement sous forme  $\text{KNO}_3$  à une concentration de 8 mM. Le  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  est remplacé par  $\text{CaSO}_4$ . Le volume final est ajusté à 41 ml. Le système est aéré soigneusement par une pompe d'aquarium. Après une période d'adaptation de 5 min, 2 ml est prélevé pour déterminer la quantité de nitrate initialement présente au temps zéro dans le milieu d'incubation. Après une période d'absorption de 8 h, les lots de plantules sont prélevés une fois que le volume d'incubation a été ajusté à 39 ml par de l'eau distillée. Les quatre plantules sont sectionnées au collet, la partie aérienne et les racines sont séparées et séchées au papier joseph. La partie aérienne et les racines séparées de chaque plantule sont mis séparément dans des sachets de papier aluminium, pesés et mis à sécher dans une étuve à 70 °C pendant 48 h. Après séchage et refroidissement, les échantillons sont pesés une deuxième fois et stockés dans un congélateur à - 20 °C. Pour déterminer l'état initial en nitrate ou autre constituant, des plantules entières sont consacrées avant la période d'absorption et sont assujetties aux mêmes analyses que les plantules qui ont servi à l'absorption.

### Mesure de l'absorption des nitrates

La quantité de nitrate absorbée par la plantule est déterminée par la disparition du nitrate du milieu d'incubation. Les nitrates présents avant et après les 8 heures d'incubation sont dosés par la méthode de Cataldo et al. (1975).

### Mesure de la réduction

La réduction du nitrate est estimée à partir des nitrates endogènes avant et après la période d'absorption selon la formule suivante:

$$(\text{NO}_3^-)_{\text{red}} = (\text{NO}_3^-)_{\text{ab}} + (\text{NO}_3^-)_i - (\text{NO}_3^-)_f$$

où  $(\text{NO}_3^-)_i$  et  $(\text{NO}_3^-)_f$  sont, respectivement, les nitrates contenus dans l'échantillon végétal avant et après absorption du nitrate.  $(\text{NO}_3^-)_{\text{ab}} = \text{NO}_3^-$  disparus après 8 h du milieu



d'incubation et  $(\text{NO}_3^-)_{\text{réd}} = \text{NO}_3^-$  réduit dans le végétal après 8 h. Le nitrate endogène est déterminé après broyage de l'échantillon et extraction des constituants hydrosolubles.

### **Extraction des constituants hydrosolubles**

Les composés azotés solubles et insolubles sont extraits des échantillons décongelés par broyage au mortier en présence du mélange ternaire: méthanol/chloroforme/eau distillée (12V/5V/3V) selon la méthode de Dickson (1979). L'extrait du broyage (10 à 15 ml) est centrifugé trois fois à 1200 g pendant 20 min. Les surnageants sont rassemblés (20 à 30 ml) et le culot est conservé à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  dans de l'eau distillée et sert pour doser l'azote insoluble. Ce protocole permet d'épuiser complètement les substances azotées solubles possédant une fonction  $\alpha$ -aminé primaire et évite la contamination de la fraction N-insoluble par les substances solubles. 10 ml de la fraction azote soluble est dé-pigmentée par addition de 25 ml de méthanol, 25 ml de chloroforme et 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  distillée. Après agitation et décantation du mélange la partie inférieure contenant les pigments et les lipides est éliminée. La partie supérieure est concentrée à l'évaporateur rotatif sous vide à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  et amenée à 2 ml avec de l'eau distillée. Elle constitue la fraction azote soluble, composée d'acides aminés libres, d'azote inorganique et de peptides solubles. Elle est conservée à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Dosage de l'azote nitrique**

Le dosage des nitrates a été effectué selon la méthode de Cataldo et al. (1975). A 100  $\mu\text{l}$  de la solution à doser (fraction azote soluble, milieu nutritif ou solution standard) est ajouté 400  $\mu\text{l}$  d'acide salicylique à 5% dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré. Le mélange est agité violemment sur vortex puis laissé réagir pendant 15 min à température ambiante. Après addition de 9.5 ml de NaOH (2N) au mélange une coloration jaune se développe. Après agitation et refroidissement du milieu réactionnel la densité optique est déterminée à 410 nm. Une gamme étalon est établie avec une solution de  $\text{KNO}_3$  à une concentration de 140  $\mu\text{g N/ml}$ .

### **Dosage de l'azote organique**

#### **a) Minéralisation de l'azote organique soluble et insoluble**

L'azote de la fraction soluble ( $\text{Ns}$ , surnageant) et la fraction insoluble ( $\text{Ni}$ , culot) sont déterminés par la méthode de Kjeldhal. Une aliquote de la fraction soluble ou la totalité de la fraction insoluble sont introduits dans un matras en présence d'acide sulfurique concentré 36N (0.15 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  pour 2 ml de  $\text{Ns}$  des racines, 0.2 ml pour 1 ml de  $\text{Ns}$  des feuilles, 0.5 ml pour  $\text{Ni}$  des racines et 1 ml pour  $\text{Ni}$  des feuilles) et de 50 mg du catalyseur de Dumarzet et Marcelet. La digestion s'effectue pendant 8 h dans un bain de sable à  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La température

est augmentée progressivement au cours des deux premières heures jusqu'à atteindre 350 °C puis est maintenue constante pendant 6 h.

### **b) Dosage de l'ammonium**

L'ammonium formé au cours de la minéralisation est dosé sur une aliquote par le réactif de Nessler (Umbreit et al., 1959). Pour cela, 4 g de KI et 4 g de HgI<sub>2</sub> sont mises en solution dans un volume de 250 ml d'eau distillée. 1.75 g d'alcool polyvinylique est dissous dans 700 ml d'eau distillée chaude. Après refroidissement, les deux solutions sont mélangées et le volume final est ajusté à 1 litre avec de l'eau distillée. Cette solution peut être conservée à 4 °C pendant maximum deux mois. A une aliquote de 0.2 à 2 ml d'échantillon 2 ml de cette solution et 3 ml de NaOH (2N) sont ajoutés. Après 25 min à l'obscurité, la DO est lue à 490 nm. Une gamme étalon est réalisée avec une solution d'oxalate d'ammonium à 20 µg N/ml.

## **Dosage des sucres**

### **a) Dosage des sucres solubles**

Les sucres présents dans la fraction soluble sont dosés à l'anthrone selon la méthode de Halhoul et Kleinberg (1972). Pour cela, 0.75 g d'anthrone est dissous dans 300 ml d'acide sulfurique concentré à 0 °C. 75 ml d'acide sulfurique concentré est mis dans 125 ml d'eau distillée à 0 °C. Après refroidissement total de cette dernière solution, on l'ajoute petit à petit à la première solution qui est agitée et trempée dans de la glace fondue. Le volume final est ensuite ajusté à 500 ml avec de l'eau distillée refroidie et conservée à 4 °C. A 100 ou 500 µl de la fraction soluble est ajouté 6 ml du réactif à 0 °C. Après agitation, les tubes sont portés à 95 °C dans un bain-marie pendant 6 min. La DO du milieu réactionnel est lue à 630 nm après refroidissement des tubes. Une gamme étalon est réalisée avec une solution de glucose à une concentration de 150 µg glucose/ml.

### **b) Dosage des sucres insolubles**

La fraction insoluble récupérée précédemment dans l'eau distillée est centrifugée à 1200 g pendant 5 min pour éliminer l'eau. Ensuite, on ajoute de l'acide sulfurique concentré au culot (0.5 ml pour les racines et 1 ml pour les feuilles) et on laisse l'hydrolyse se faire à température ambiante. Après 24 h, le mélange obtenu après hydrolyse est dilué avec de l'eau distillée (20 à 30 ml) et les sucres solubles obtenus sont dosés à l'anthrone comme a été décrit précédemment pour les sucres de la fraction soluble.

## Résultats

### Distribution de la masse de matière sèche

Le Tableau 1 montre des masses de matière sèche (MS) par plantule variables d'une variété à une autre. La MS est faible chez Achtar, élevée chez Saba et intermédiaire chez les deux autres variétés. La répartition de la MS entre les racines et la partie aérienne montre qu'au stade 21 jours, les racines représentent 22 à 27% et la partie aérienne 73 à 78% de la masse de matière sèche de la plante entière. Le fait qu'une part non négligeable de biomasse (22 à 27%) est localisée au niveau des racines montre l'importance de l'appareil racinaire dans les stades précoces du développement de la plante.

### Distribution des nitrates dans la plantule

La détermination des nitrates dans les racines et la partie aérienne montre que 76 à 82% des  $\text{NO}_3^-$  de la plantule sont accumulés dans la partie aérienne et 18 à 24% dans les racines (Tab. 2). Les teneurs en nitrate exprimées en mg/g MS de la partie aérienne restent supérieures à celles des racines et varient d'une variété à une autre. Tegye32 est la variété qui présente les teneurs en nitrate les plus élevées particulièrement au niveau des feuilles. La variété Achtar se distingue par un mode de répartition des nitrates différent des autres variétés. Une diminution dans l'accumulation des nitrates d'environ 6% du nitrate de la plantule est observée dans la partie aérienne de Achtar par rapport aux autres variétés. Elle accumule 483.5 à 926.5  $\mu\text{g}$  de nitrates de moins que les autres variétés dans sa partie aérienne, tandis qu'elle accumule presque autant de  $\text{NO}_3^-$  dans ses racines que les autres variétés.

### Distribution des sucres solubles et insolubles dans la plante

La répartition des sucres totaux entre les racines et la partie aérienne est représentée dans le Tableau 3A. Les résultats montrent que les sucres totaux des jeunes plantules de blé tendre se répartissent entre 25.4 à 33.2% dans les racines et 66.8 à 74.6% dans la partie aérienne. La partie aérienne renferme 84.7 à 89.7% des sucres solubles de la plante et les racines 10.3 à 15.3% (Tab. 3B). Pour les sucres insolubles, 64.5 à 73.1% sont localisés dans la partie aérienne et 26.9 à 35.5% dans les racines (Tab. 3C).

Dans la plante, les sucres totaux sont essentiellement sous forme insoluble (90.4 à 91.7%), et seulement 8.3 à 9.6% sous forme soluble (Tab. 3D). Dans la partie aérienne, les sucres insolubles représentent 88.5 à 89.7% des sucres totaux et les sucres solubles seulement 10.3 à 12.2% (Tab. 3E). Dans les racines, les sucres insolubles représentent 95.5 à 97.2% des sucres totaux et les sucres solubles seulement 2.8 à 4.5% (Tab. 3F).

En terme de sucres totaux, Achtar, à un degré élevé, et Saâda et Tegye32, à un degré plus faible, présentent l'accumulation de sucres la plus faible et Saba l'accumulation de sucres la plus élevée (Tab. 3A). Cette supériorité de Saba est observée aussi bien au niveau des sucres solubles et insolubles de la plante entière et de la partie aérienne qu'au niveau des sucres insolubles des racines. Par contre, au niveau des sucres solubles des racines, elle ne se distingue point des autres variétés. De ce fait, si on exprime les sucres solubles racinaires des variétés en % des sucres solubles de la plantule entière, la variété Achtar, et à un degré plus faible, Saâda et Tegye32 présenteront des proportions en sucres solubles racinaires plus élevées que la variété Saba.

L'analyse des teneurs en sucres montre aussi que la majeure partie des réserves en sucres de la plante sont sous forme insoluble. Les sucres solubles restent toujours faibles comparés aux sucres insolubles (Tab. 4). La teneur en sucres insolubles des racines est légèrement plus élevée que celle de la partie aérienne (Tabx. 5 et 6). Par contre, la teneur en sucres solubles de la partie aérienne est nettement supérieure à celle des racines (Tabx. 5 et 6). Dans tous les organes, de légères différences variétales en sucres insolubles sont observées (Tabx. 4, 5 et 6). Par ailleurs, au niveau de la plante entière et de la partie aérienne, la variété Achtar se distingue en particulier de la variété Saba par une teneur en sucres solubles plus faible. Par contre, au niveau des racines, elle présente une teneur en sucres solubles plus élevée que Saba (Tab. 6).

### **Absorption des nitrates**

L'analyse de la cinétique d'absorption chez les quatre variétés montre des valeurs d'absorption faibles allant de  $-109$  à  $+109.2$   $\mu\text{g/plante}$  (Tab. 7). Une absorption nette positive est décelée après 4 et 6 h chez Achtar, et après seulement 6 h chez Saâda et Saba. Par contre, l'absorption nette reste négative durant le 6 h de la cinétique chez Tegye32.

### **Réduction des nitrates**

Le Tableau 8 représente les  $\text{NO}_3^-$  réduits au cours d'une cinétique d'exposition aux nitrates. La réduction des  $\text{NO}_3^-$  augmente légèrement avec le temps. La réduction et la vitesse de réduction sont plus importantes chez Achtar que les autres variétés. Cependant, la vitesse de réduction diminue chez Achtar après 2 h mais reste relativement constante chez les autres variétés (Tab. 9).

## Discussion

Dans le but de réunir plus d'informations et afin d'établir une image plus complète de nos variétés on essaye dans ce chapitre de re-discuter les données déjà acquises dans les chapitres 1 et 2 en parallèle avec les données de l'absorption, réduction et accumulation des nitrates en relation avec les sucres.

Le suivi de l'élongation foliaire avait montré que la croissance d'une feuille est arrêtée par l'apparition de feuille plus jeune (**chapitre 1**). Cet arrêt est peut-être d'origine trophique ou hormonale ou les deux à la fois. Une précocité dans l'apparition de F3 et F4 chez Tegye32 et de F3 chez Saâda par rapport à Achtar et Saba est observée. Ce décalage variétal dans l'apparition de F3 et F4 ne suit pas la différence variétale d'élongation de F1 et F2 puisque Saba qui n'est pas précoce présente comme même une élongation de la F1 et F2 aussi importante que Saâda et Tegye32. Par contre, le rythme d'apparition de la F3 et F4 pour Achtar et Tegye32 ainsi que celui de la F3 pour Saâda évoluent dans le même sens que l'élongation de F1 et F2 (Fig. 2, **chapitre 1**).

Par ailleurs, malgré une supériorité de la surface foliaire des variétés Achtar et Saba sur Saâda et Tegye32 et une similitude entre Achtar et Saba (BenDriss Amraoui et al., 1998a, **chapitre 1**), la variété Achtar présente une accumulation de biomasse foliaire plus faible par rapport aux autres variétés (Tab. 1). Ce résultat indique que les cellules foliaires du limbe de cette variété sont probablement plus large mais plus faible en nombre par rapport aux autres variétés. Ceci est confirmé par la faible élongation foliaire de cette variété (BenDriss Amraoui et al., 1998a) due probablement à la présence dans ces tissus foliaires de cellules moins allongées (Beauchamp et Lathwell, 1966).

Malgré que les variétés Achtar et Saba présentent des surfaces foliaires supérieures à celles de Saâda et Tegye32, leurs transpirations sont similaires à celle de Saâda et faibles par rapport à Tegye32 (**chapitre 1**). Ceci suggère la présence dans les feuilles de Saâda et Tegye32 d'un nombre de stomates ou d'un degré d'ouverture de stomates plus important que chez Achtar et Saba. Cette différence existe-t-elle au niveau de tous les rangs foliaires ou bien dans un seul rang? La réponse précise à cette question ne figure pas dans ce mémoire et reste encore à élucider par d'autres études sur la répartition et le degré d'ouverture des stomates. Cependant, si l'on tient compte des différences variétales observées dans la partie aérienne on peut penser qu'à ce stade de développement tous les rangs foliaires pourraient être impliqués.

L'estimation du RWC (**chapitre 1**) montre que les quatre variétés étaient en excellente condition d'hydratation. Cependant, du fait que l'état de l'eau dans une plante est fonction de l'équilibre entre l'eau absorbée par les racines et l'eau rejetée par transpiration le maintien chez la variété Tegyey32 d'un état hydrique comparable à celui des autres variétés bien qu'elle ait une transpiration plus élevée suppose une absorption d'eau plus importante par Tegyey32 par rapport aux autres variétés.

En terme de quantités ou de teneurs, l'accumulation des nitrates est favorisée au niveau des parties aériennes chez les quatre variétés étudiées. Ce comportement est probablement lié aux conditions de culture utilisées ici (alimentation nitrique de 8 mM et hydroponie). Wallace (1986) a montré qu'une accumulation importante de nitrate se produit au niveau de la partie aérienne des plantules de blé cultivées sur des concentrations en nitrate allant de 5 à 10 mM. Par ailleurs, Hannachi et al. (1998) ont trouvé chez le blé que le type de sol au contact du système racinaire influence le flux de nitrate vers les feuilles, la remobilisation du nitrate stocké, l'activité NR foliaire, et la capacité de la plante à utiliser le nitrate, par contre, il n'affecte pas le flux d'azote réduit vers les feuilles.

La comparaison inter-variétale indique que Achtar se distingue par une faible accumulation des nitrates que les autres variétés. Cette faible accumulation se manifeste-t-elle au niveau des racines, de la partie aérienne, ou des deux à la fois? La quantité des nitrates dans les racines de Achtar ne diffère pas significativement des autres variétés malgré qu'une proportion (23.8%) relativement élevée des nitrates de la plante soit retenue au niveau de ces racines (Tab. 2). Par contre, Achtar accumule moins de nitrates que les autres variétés dans la partie aérienne. Ce résultat peut être expliqué par (i) une faible absorption des nitrates chez Achtar associée à un faible transfert de nitrate vers la partie aérienne ou (ii) une forte assimilation des  $\text{NO}_3^-$  dans la partie aérienne.

En terme de teneurs, la différence variétale dans l'accumulation des nitrates dans la partie aérienne est atténuée entre Achtar et les deux variétés Saâda et Saba, mais reste accentuée entre Achtar et Tegyey32. Ceci est dû au fait que la supériorité de Saâda et Saba par rapport à Achtar en quantités de nitrates accumulés était due à une supériorité de masse de matière sèche de ces deux variétés car lorsque les quantités accumulées sont ramenées à l'unité de masse ces différences tendent à diminuer. Par contre, Tegyey32 présente toujours une supériorité en nitrates par rapport à Achtar même en terme de teneur car sa partie aérienne accumule des quantités de nitrates plus importantes que chez Achtar malgré qu'elle accumule une masse de matière sèche relativement semblable à celle de Achtar.

Ces observations montrent l'existence d'une relation positive entre l'accumulation des nitrates et la production de matière sèche de la partie aérienne chez toutes les variétés, à l'exception de Tegye<sup>32</sup>. Ce contraste dans le comportement des variétés de blé dans la relation entre le stockage des nitrates et la production de matière sèche foliaire rappelle celui trouvé chez le maïs entre le stockage de l'amidon et du saccharose et la production de matière sèche racinaire et foliaire (Rocher, 1984). Ces faits soulignent l'importance de la partie aérienne dans la distribution du carbone et dans le stockage du nitrate.

Les résultats concernant les analyses de sucres montrent qu'en terme de quantité ou de teneur la majeure partie des réserves en sucres de la plante sont sous forme insoluble. En quantité, ces sucres sont essentiellement contenus dans la partie aérienne mais en teneur elles sont légèrement plus élevée dans les racines que dans la partie aérienne. Ce résultat concorde avec ceux de Abdellaoui et al. (1998b) qui ont trouvé que les racines de variétés marocaines de blé tendre bien alimentées en nitrate possèdent plus de sucres insolubles que la partie aérienne. Ceci peut être dû au fait que les racines sont plus riches en lignine et en cellulose par rapport à la partie aérienne (Bergkotte, 1991). Toutefois, il est vraisemblable que ce mode de répartition du carbone de la forme insoluble entre les racines et la partie aérienne soit lié aux conditions de culture notamment au niveau de la nutrition nitrique du fait de la relation étroite qui existe entre l'assimilation du carbone et celle de l'azote. Cette répartition serait-elle modifiée dans d'autres conditions d'apport nitrique tel qu'une carence en nitrate?

A la différence des sucres insolubles, les sucres solubles sont nettement plus importants dans la partie aérienne que dans les racines en quantité et teneur. Ce fait est dû au déroulement de la photosynthèse dans la partie aérienne. Le fait que les racines possèdent des teneurs en sucres insolubles relativement élevées malgré qu'elles contiennent 5 à 9 fois moins de sucres solubles que la partie aérienne suggère l'existence d'une migration des sucres des feuilles vers les racines associée à une importante utilisation de ces sucres dans la synthèse de paroi et membrane cellulaire de la racine.

La comparaison variétale montre que Achar suivie de Saâda et Tegye<sup>32</sup> présentent l'accumulation de sucres par plante la plus faible et Saba l'accumulation de sucres la plus élevée (Tab. 3A). La répartition des sucres solubles et insolubles entre les racines et la partie aérienne diffère chez les variétés. La supériorité de Saba en accumulation de sucres (Tab. 3A) est observée aussi bien au niveau des sucres solubles et insolubles de la plante entière et la partie aérienne qu'au niveau des sucres insolubles des racines (Tabx. 3B et 3C). Par contre, elle ne se distingue point des autres variétés au niveau des sucres solubles des racines.

La proportion de sucres solubles dans les racines est plus élevée chez Achtar par rapport aux autres variétés bien que sa partie aérienne possède la plus faible quantité de sucres solubles (Tab. 3B). Ceci est confirmé chez cette variété même en terme de teneur. En effet, le rapport racines/partie aérienne en sucres solubles calculé à partir du Tableau 3B est plus élevé chez la variété Achtar (0.18) que les autres variétés (Saâda: 0.12, Saba: 0.11, Tegye32: 0.12). Ce fait laisse supposer que soit cette variété exporte plus de sucres vers ces racines par rapport à ce qu'elle synthétise dans les feuilles soit qu'elle en synthétise peu ou en consomme plus dans les feuilles soit les trois à la fois. L'utilisation de marquage isotopique au  $^{14}\text{CO}_2$  permettra de tester ces hypothèses et d'estimer (i) la capacité photosynthétique par mesure de la quantité de  $^{14}\text{C}$  retrouvée dans la plante, (ii) le transfert de sucres vers les racines par le  $^{14}\text{C}$  retrouvé dans les racines ainsi que (iii) la capacité respiratoire par le  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé par la plante au niveau racinaire et foliaire.

Les quatre variétés ne se distinguent pas dans le modèle de répartition des sucres entre la forme soluble et la forme insoluble au niveau de la plantule entière et la partie aérienne (Tabx. 3D et 3E). En revanche, l'examen de la répartition des sucres solubles et insolubles dans les racines montre l'existence d'un détournement des sucres solubles au profit des sucres insolubles chez la variété Saba comparée aux autres variétés (soluble: 2.8% et insoluble: 97.2%, Tab. 3F).

L'analyse des teneurs en sucres montre qu'au niveau des sucres solubles la variété Achtar se distingue en particulier de Saba par une teneur en sucres solubles plus faible dans la partie aérienne et la plante entière (Tabx. 4 et 5). Par contre, la différence en sucres solubles entre ces deux variétés est plus faible au niveau des racines (Tab. 6). Ceci confirme les faibles différences entre Achtar et Saba en quantités de sucres solubles. Au niveau des teneurs en sucres insolubles, de légères différences variétales sont observées qu'il s'agit de la plante entière, de la partie aérienne ou des racines (Tab. 5). Ceci est dû au fait que les sucres insolubles suivent de près la masse de matière sèche.

Ces observations sont en accord avec l'existence d'une protidogenèse foliaire accrue chez la variété Saba (**chapitre 2**). Dans le chapitre 2, il a été aussi supposé que cette protidogenèse accrue pourrait être l'indice d'une faible accumulation de glucides dans les racines au cas où une compétition entre l'accumulation des glucides et la synthèse de protides existe et se manifeste à l'égard de la glucogenèse. Dans ce chapitre, la faible proportion des sucres solubles notée dans les racines (soluble: 2.8% et insoluble: 97.2%, Tab. 3F) de la variété Saba par rapport aux autres variétés est en faveur de cette hypothèse et montre l'existence d'une nette interaction entre le métabolisme du nitrate et celui des sucres.



Dans nos conditions de culture, les quatre variétés présentent une absorption nette négative des  $\text{NO}_3^-$  au début de la cinétique d'absorption (Tab. 7). Cette absorption est due à une supériorité de l'efflux par rapport à l'influx (Talouizte, 1990). En effet, l'influx des  $\text{NO}_3^-$  peut être masqué par l'efflux lorsque la concentration en  $\text{NO}_3^-$  du milieu extérieur ou en nitrates endogènes sont élevés (Chantarotwong et al., 1976; MacKown et al., 1981 et 1983; Kronzucker et al., 1995). L'absorption nette négative des  $\text{NO}_3^-$  est suivie par une absorption nette positive tôt (4 h) chez la variété Achtar et seulement après 6 h chez Saâda et Saba. Par contre, la variété Tegye32 continue d'exorber les  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu extérieur. Ce retard dans l'apparition d'une absorption nette positive au début de la cinétique peut être dû à une phase d'adaptation des plantules au milieu d'incubation.

D'après Bloom et Sukrapana (1990), le transfert des plantes d'un récipient à un autre provoque des perturbations au niveau des racines. Ces perturbations mécaniques se traduisent par une diminution de l'absorption nette suite à une stimulation de l'efflux qui peut durer quelques minutes à quelques heures (Aslam et al., 1996). D'autre part, selon Ter Steege et Stulen (1997), Ter Steege et al. (1998) et Ter Steege et al. (1999) les risques de perturbations de l'absorption sont élevées dans des expériences à court terme. Ces auteurs ont montré que non seulement l'efflux mais aussi l'influx de nitrate est altéré même si les plantules sont doucement manipulées. Selon ces auteurs, l'impact de la manipulation et le temps de rétablissement de l'absorption dépendent de la sévérité de la perturbation. Nos résultats concordent avec ces observations et montrent une variabilité génétique dans l'adaptation de l'absorption des nitrates à la manipulation.

Scheurwater et al. (1999) ont montré que la vitesse d'absorption des nitrates est élevée au milieu de la photopériode chez des espèces grasses. Ils ont également trouvé que la variation diurne de l'absorption est principalement due à la variation de l'influx du nitrate et que celle de l'efflux des nitrates ne se produit pas chez toutes les espèces. L'efflux est plus important à l'obscurité qu'à la lumière chez les espèces grasses qui croissent lentement (slow-growing grasses) et ne varie pas chez les espèces qui croissent rapidement (fast-growing grasses). Ces observations montrent que les variations de l'absorption entre espèces à l'obscurité sont dues, pour une large part, aux variations de l'efflux et laissent penser que les différences variétales obtenues ici peuvent être aussi dues à une augmentation de l'efflux et une altération de l'influx.

L'assimilation des  $\text{NO}_3^-$  contrairement à leurs absorption est relativement importante depuis les premières heures de la cinétique (Tab. 8). Ce résultat indique-t-il que les  $\text{NO}_3^-$

assimilés concernent en majorité les  $\text{NO}_3^-$  pré-existant avant la cinétique? Les travaux de MacKown et al. (1981 et 1982) et Talouizte et al. (1984) ont montré que la réduction concerne les  $\text{NO}_3^-$  récemment absorbés et même lorsque la plante utilise les  $\text{NO}_3^-$  accumulés, la réduction est faible (Gojon et al., 1991). Les faibles valeurs de l'absorption obtenues ici (allant de  $-109$  à  $+109.2 \mu\text{g}$ ) indiquent l'existence d'un efflux légèrement supérieur ou inférieur à l'influx. Le fait qu'à la lumière une absorption nette négative ne peut pas exclure totalement l'existence d'un influx des  $\text{NO}_3^-$  laisse supposer qu'une réduction des nitrates peut avoir eu lieu aussi à partir des nitrates récemment absorbés mais la proportion de cette réduction et celle à partir des nitrates endogènes restent inconnue et ne peut pas être déterminée ici.

La comparaison inter-variétale montre que Achtar se distingue par une vitesse d'assimilation des  $\text{NO}_3^-$  élevée en particulier durant les deux premières heures de la cinétique (Tab. 9). Cette vitesse d'assimilation élevée à 2 h serait en faveur d'une stimulation de l'absorption racinaire pour une durée d'absorption plus longue (4 et 6 h) chez cette variété (Tabx. 7 et 9). En effet, selon Davies (1986) et Ben-Zioni et al. (1971), la réduction des  $\text{NO}_3^-$  dans les racines et les feuilles favorise l'absorption des  $\text{NO}_3^-$  par l'ion  $\text{OH}^-$  issu de la réduction du nitrate racinaire ou par l'ion  $\text{HCO}_3^-$  résultant du fonctionnement du pH-stat foliaire (Kirkby et Armstrong, 1980; Talouizte et al., 1989 et 1990; Touraine et al., 1992). Cependant, d'après Butz et Jackson (1977) l'absorption et la réduction pourraient faire intervenir un même complexe enzymatique capable d'assurer simultanément le transport et la réduction des nitrates. D'autres observations suggèrent que la réduction serait plutôt commandée par l'absorption du fait que la quantité réduite représente une fraction constante de la quantité absorbée (Chantarotwong et al., 1976; Shaner et Boyer, 1976; MacKown et al., 1981). Plusieurs autres arguments expérimentaux supposent que l'absorption et la réduction sont indépendamment régulées (MacKown et al., 1982; Morgan et al., 1985). Pour concilier l'ensemble de ces observations Morgan et al. (1985) suggère que l'absorption et la réduction font intervenir deux protéines distinctes inductibles par le nitrate.

Dans le présent travail, le fait qu'un accroissement progressif de la réduction obtenu durant les 6 h est suivie par une augmentation de l'absorption chez toutes les variétés, excepté Tegye32, suggère une étroite relation entre l'absorption et la réduction qui semble suivre de très près l'absorption. Toutefois, ce fait ne permet pas de confirmer si l'absorption suit la réduction ou c'est la réduction qui suit l'absorption.

On ne peut non plus confirmer si la manipulation des plantules affecte directement l'absorption via son effet sur l'influx et l'efflux qui peuvent agir aussi sur la réduction ou bien indirectement via son effet sur la réduction qui peut influencer l'influx et l'efflux ou bien que le stress mécanique affecte indépendamment les processus d'absorption et réduction des nitrates. La translocation des nitrates et la réduction foliaire des  $\text{NO}_3^-$  et du  $\text{CO}_2$  sont-elles aussi affectées? La réponse de ces processus au stress mécanique affectent-elles, et dans quelle limite, la réponse des processus d'absorption des nitrates?

Dans le présent travail, les faibles capacités d'absorption tendent à disparaître chez les quatre variétés, à l'exception de Tegye32, au fur et à mesure que le séjour des plantules sur solution d'incubation est prolongé. Ce comportement vis à vis des  $\text{NO}_3^-$  légèrement différent chez les quatre variétés peut-il être aussi expliqué par l'état azoté des plantes avant la période d'absorption (MacKown et al., 1981). En effet, l'absorption des  $\text{NO}_3^-$  est fortement influencée par les teneurs en azote minéral et organique des plantes. En effet, les  $\text{NO}_3^-$  sont capables d'exercer un contrôle par Feed back de l'absorption (King et al., 1993). Selon Jackson et al. (1976), des concentrations élevées en  $\text{NO}_3^-$  endogènes diminuent l'absorption nette en favorisant l'efflux des  $\text{NO}_3^-$  vers le milieu extérieur. Talouizte et al. (1986) et King et al. (1993) suggèrent que l'augmentation de la concentration des  $\text{NO}_3^-$  dans les tissus des plantes peut être un inhibiteur de l'absorption nette des  $\text{NO}_3^-$ . Les  $\text{NO}_3^-$  accumulés dans les racines peuvent inhiber l'absorption nette des  $\text{NO}_3^-$  en favorisant l'efflux des  $\text{NO}_3^-$  vers le milieu extérieur. D'après plusieurs auteurs (Breteler et Nissen, 1982; Deane Drummond et Glass, 1983; Chaillou et al., 1994), ce contrôle de l'absorption nette par la concentration interne des  $\text{NO}_3^-$  se fait plutôt par l'efflux que par l'influx. La détermination de l'azote soluble et insoluble chez les quatre variétés (BenDriss Amraoui et al., 1998b, **chapitre 2**) montre que les variétés ne se distinguent pas en azote organique soluble ni même en  $\text{NO}_3^-$  endogène au niveau des racines. Ce fait concorde avec les faibles différences variétales d'absorption des  $\text{NO}_3^-$  retrouvées même après 6 h.

Par ailleurs, selon Ben-Zioni et al. (1971) la vitesse de réduction des nitrates dans les feuilles contrôle l'absorption des nitrates par les racines. Récemment, Lainé et al. (1995) suggèrent que la partie aérienne contrôle principalement l'absorption des  $\text{NO}_3^-$  par les racines du fait qu'une corrélation négative et significative existe entre la teneur en  $\text{NO}_3^-$  de la partie aérienne et l'absorption. Toutefois, le mécanisme de ce contrôle reste non identifié. Le fait que le nitrate foliaire n'est pas re-transporté vers les racines suggère que ce contrôle par le nitrate peut se faire par les produits de son assimilation (acides aminés ou acides organiques, Touraine et al., 1988, 1992; Muller et Touraine, 1992; Muller et al., 1995). La variété

Tegyey32 qui se distingue des autres variétés par une absorption nette négative des  $\text{NO}_3^-$  (efflux plus important que l'influx) pendant toute la cinétique (Tab. 7) montre également une supériorité quant à l'accumulation des  $\text{NO}_3^-$  foliaires. D'autre part, la variété Saba qui présente une très faible teneur en N organique foliaire (**chapitre 2**) montre une absorption non négative (nulle) pendant les 4 premières heures suivie de la plus importante absorption à 6 h (+ 109  $\mu\text{g/plante}$ ).

Ce comportement de Saba rappelle celui du soja en phase de croissance végétative ou la réduction foliaire de nitrate est élevée, entraînant une forte production d'acides organiques et d'acides aminés. Les acides organiques sont majoritairement exportés vers les racines, alors qu'une grande partie des acides aminés est utilisée localement, pour la synthèse de protéique (Imsande et Touraine, 1994). Il en résulte une stimulation de l'absorption par augmentation de la disponibilité de  $\text{HCO}_3^-$  dans les racines. Quand la synthèse protéique foliaire est faible et/ou la remobilisation des protéines est élevée, les acides aminés foliaires libres sont injectés dans le pool circulant de la plante. Simultanément à l'accroissement de l'exportation des acides aminés vers les racines, si la réduction foliaire de  $\text{NO}_3^-$  décline pendant ce temps, la production nette d'acides organiques dans les feuilles baisse et la disponibilité de  $\text{HCO}_3^-$  dans les racines chute, entraînant une diminution de l'absorption. Ce dernier cas rappelle celui de Tegyey32.

Ensemble, ces observations concordent avec ceux de Touraine et al. (1992), Muller et Touraine (1992), Lainé et al. (1995) et Muller et al. (1995). Elles montrent que l'absorption des  $\text{NO}_3^-$  est influencée par les teneurs en nitrates, en N organique soluble et acides organiques foliaires. Cependant, il serait important de voir si cette influence sur l'absorption concerne uniquement l'influx (Ben-Zioni et al., 1971; Muller et al., 1995) ou bien l'influx et l'efflux qui en résulte.

## Conclusion

En conclusion, l'analyse des paramètres morphophysiologiques de base de la production de matière sèche révèle une différence dans le comportement des génotypes étudiés (**chapitre 1**). Le suivi de l'élongation foliaire montre qu'une liaison négative entre le rythme d'apparition de la F3 et F4 et l'élongation de la F1 et F2 existe chez toutes les variétés, à l'exception de Saba. Une différence remarquable existe aussi entre Achtar et les autres variétés au niveau de l'élongation foliaire, et en particulier celle des feuilles de rang 1 et 2, tandis que pour les feuilles de rang 3 et 4, l'écart d'élongation entre Achtar et les variétés Saâda et Tegye32 diminue. La croissance n'est cependant pas moins importante chez Achtar du fait qu'elle présente une surface foliaire similaire à celle de la variété Saba, et plus élevée que celle des variétés Saâda et Tegye32. Il en résulte que l'utilisation du critère surface foliaire pour évaluer la croissance est préférable à l'élongation du fait que c'est un paramètre qui tient compte de la longueur et de la largeur de la feuille et donne donc plus d'information sur la variété. L'examen de la teneur en eau relative des plantules ne permet pas de distinguer les quatre variétés. Cependant la variété Tegye32 présente une transpiration élevée liée probablement à une absorption d'eau accrue.

La faible accumulation de matière sèche, en particulier de la partie aérienne, chez Achtar par rapport à Saba malgré une similitude en surface foliaire nous laisse suggérer que la partie aérienne de Achtar a probablement des parois cellulaires moins épaisses et moins rigides que chez Saba.

L'accumulation des nitrates prédomine dans la partie aérienne par rapport aux racines et est la conséquence d'un flux de nitrate accru vers les feuilles à partir des racines. Elle est importante chez Tegye32 par rapport aux autres variétés et coïncide bien avec une transpiration élevée notée chez cette variété. L'analyse des composés azotés indique que seule la variété Saba se distingue des autres variétés par des teneurs faibles en azote total et surtout soluble au niveau des feuilles (**chapitre 2**). Cette faible accumulation de l'azote soluble dans les feuilles de Saba résulterait probablement d'une protidogenèse foliaire accrue associée aux processus de transport accru de l'azote soluble des racines vers la partie aérienne.

La répartition des sucres entre la forme soluble et insoluble dans les racines et dans la partie aérienne diffère d'une variété à une autre. Saba accumule plus de sucres insolubles dans les racines et la partie aérienne et plus de sucres solubles seulement dans la partie aérienne que Achtar, tandis que Saâda et Tegye32 accumulent des quantités intermédiaires. Dans la présente étude, la faible proportion des sucres solubles notée dans les racines (soluble: 2.8%

contre l'insoluble: 97.2%, Tab. 3F) de Saba comparée aux autres variétés témoigne de l'existence d'une synthèse de protides accrue probablement en faveur de celle détectée dans les feuilles de cette variété (**chapitre 2**). Ces observations confirment notre hypothèse selon laquelle, chez Saba, les parois cellulaires de la partie aérienne, au dépend du système racinaire, sont plus épaisses et rigides que chez Achtar. Les analyses de l'efflux des nitrates à partir du système racinaire chez ces variétés sont aussi en faveur de cette suggestion (**chapitres 4, 5, 7 et 8**).

Bien que les résultats de l'absorption des nitrates montrent de faibles différences variétales, la variété Achtar assimile plus de nitrates que les autres variétés. Par ailleurs, le fait que les quatre variétés de blé présentent des différences significatives en nitrates, en azote organique soluble et en sucres solubles uniquement au niveau foliaire suggère l'existence d'une différence variétale dans l'assimilation foliaire des nitrates. Malgré que Achtar possède une teneur en azote organique soluble semblable à celle de Saâda et Tegyey<sup>32</sup> et supérieure à celle de Saba, cette variété présente dans sa partie aérienne les plus faibles teneurs en nitrates et en sucres solubles comparée aux autres variétés. Ce fait concorde avec l'estimation de la réduction après une courte période d'absorption chez Achtar (Tab. 8). Il suggère une importante assimilation des nitrates dans les feuilles et/ou dans les racines associée à un important transfert d'azote organique soluble vers la partie aérienne chez cette variété.

### Références bibliographiques

- Abdellaoui, A., Talouizte, A. 2001. Effect of previous nitrogen starvation on  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  uptake and assimilation associated with the endogenous soluble carbohydrates utilization in moroccan wheat seedlings. J. Plant Nutr. (sous presse).
- Abdellaoui, A., Larhnm, A., Talouizte, A. 1998b. Assimilation des nitrates chez quelques variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) marocain. In: El Mtili, N., (Ed.), Act. J. Sc. sur le Blé Oujda, Maroc, pp. 85-91.
- Aslam, M., Travis, R. L., Rains, D. W., Huffaker, R. C. 1996. Effect of root perturbation and excision on nitrate influx and efflux in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedling. Physiol. Plant. 97, 425-432.
- Aouad, A., Baaziz, M., Mergoum, M. 1998. Evaluation des peroxydases comme marqueurs dans l'amélioration pour la tolérance à la salinité du blé et d'autres céréales. In: El Mtili, N., (Ed.), Act. J. Sc. sur le Blé Oujda, Maroc, pp. 50-55.
- Beauchamp, E. G., Lathwell, D. J. 1966. Effect of root zone temperature on corn leaf morphology. Can J. Plant Sci. 46, 593-601.
- BenDriss Amraoui, M., Malali, A., Talouizte, A. 1998a. Analyse comparative de paramètres morphophysiologiques au stade jeune de quatre génotypes de blé tendre marocain (*Triticum aestivum* L.). In: El Mtili, N., (Ed.), Act. J. Sc. sur le Blé Oujda, Maroc, pp. 66-73.
- BenDriss Amraoui, M., Malali, A., Talouizte, A. 1998b. Etude du métabolisme des nitrates chez quatre génotypes de blé tendre marocain (*Triticum aestivum* L.). In: El Mtili, N., (Ed.), Act. J. Sc. sur le Blé Oujda, Maroc, pp. 92-96.
- Benmalek, M. 1998. Essais variétaux de blés en périmètre irrigué de la basse moulouya. In: El Mtili, N., (Ed.), Act. J. Sc. sur le Blé Oujda, Maroc, pp. 102-107.
- Ben-Zioni, A., Vaadia, Y., Lips, S. M. 1971. Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products in the shoot. Physiol. Plant. 24, 288-290.
- Bergkotte, M. 1991. Chemical composition of 24 wild species differing in relative growth rate. In: Poorter, H., (Ed.), Interspecific variation in the relative growth rate of plant: The underlying mechanism. Netherlands, pp. 47-54.
- Bloom, A. J., Sukrapanna, S. S. 1990. Effects of exposure to ammonium and transplant Shock upon the induction of nitrate absorption. Plant Physiol. 94, 85-90.

- Bouaziz, A., Soudi, B. 1998. Fertilisation azotée du blé dur (*Triticum durum* Desf L.) en irrigué dans le doukkala (Maroc). Act. inst. Agron. Vet. (Maroc) 18, 139-150.
- Breteler, H., Nissen, P. 1982. Effect of exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilisation by dwarf bean. Plant Physiol. 70, 754-759.
- Butz, R. G., Jackson, W. A. 1977. A mechanism for nitrate transport and reduction. Phytochem. 16, 409-417.
- Cataldo, D. A., Haroon, M., Schrader, L. E., Youngs, V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 6, 71-80.
- Chantarotwong, W., Huffaker, R. C., Miller, B. L., Grandstedt, R. C. 1976. In vivo nitrate reduction in relation to nitrate uptake, nitrate content and in vitro nitrate reductase activity in intact barley seedlings. Plant Physiol. 57, 519-522.
- Chaillou, S., Rideout, J. W., Raper, C. D., Morot-Gaudry, J.-F. 1994. Responses of soybean to ammonium and nitrate supplied in combination to the whole root system or separately in a split-root system. Physiol. Plant. 90, 259-268.
- Davies, D. D. 1986. The fine control of cytosolic pH. Physiol. Plant. 67, 702-706.
- Deane-Drummond, C. E., Glass, A. D. M. 1983. Short term studies of nitrate uptake into barley plants using ion specific electrodes and  $^{36}\text{ClO}_3^-$ . Control of net uptake by nitrate efflux. Plant Physiol. 73, 100-104.
- Dickson, R. E. 1979. Analytical procedures for the sequential extraction of  $^{14}\text{C}$ -labeled constituents from leaves, bark, and wood of cotton wood plants. Physiol. Plant. 45, 480-488.
- Gojon, A., Bussi, C., Grignon, C., Salsac, A. 1991. Distribution of  $\text{NO}_3^-$  reduction between roots and shoots of peach tree seedlings as affected by  $\text{NO}_3^-$  uptake rate. Physiol. Plant. 82, 505-512.
- Halhoul, M. N., Kleinberg, I. 1972. Differential determination of glucose and fructose, and glucose and fructose yielding substances with anthrone. Ann. Biochem. 50, 337-343.
- Hannachi, L., Bousser, A., Deléens, E. 1998. Effect of soil type on nitrate uptake by wheat shoots characterized using  $^{15}\text{N}$ -labelled  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -fertilizer and in vitro leaf nitrate reductase activity. Aust. J. Plant Physiol. 25, 465-474.
- Imsande, J., Touraine, B. 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. Plant Physiol. 105, 3-7.
- Jackson, W. A., Kwik, K. D., Volk, R. J., Butz, R. G. 1976. Nitrate influx and efflux by intact



- wheat seedlings : effect of prior nitrogen nutrition. *Planta* 132, 149-156.
- Karrou, M. 1992. Physiological and morphological traits associated with nitrogen uptake and use in moroccan wheats at different moisture regimes. Ph. D. Diss. University of Nebraska Lincoln. Lincoln USA.
- Karrou, M. 1996. Variation génotypique de l'efficacité d'utilisation de l'azote chez le blé tendre. *AL Awamia* 95, 39-51.
- Karrou, M., Maranville, J. W. 1994. Response of wheat cultivars to different soil nitrogen and moisture regimes: II. Nitrogen uptake, partitioning and influx. *J. Plant. Nutr.* 17, 745-761.
- King, B. J., Siddiqi, M. Y., Ruth, T. J., Warner, R. L., Glass, A. D. M. 1993. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. *Plant Physiol.* 102, 1279-1286.
- Kirkby, E. A., Armstrong, M. J. 1980. Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate assimilation in shoot of castor oil plants. *Plant Physiol.* 65, 286-290.
- Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M. 1995. Compartmentation and flux characteristics of nitrate in spruce. *Planta* 196, 674-682.
- Lainé, P., Oury, A., Boucaud, J. 1995. Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L.: effects of localized nitrate supply. *Planta* 196, 77-83.
- MacKown, C. T., Jackson, W. A., Volk, R. J. 1982. Restricted nitrate influx and reduction in corn seedlings exposed to ammonium. *Plant Physiol.* 69, 353-359.
- MacKown, C. T., Jackson, W. A., Volk, R. J. 1983. Partitioning of previously-accumulated nitrate to translocation, reduction, and efflux in corn roots. *Planta* 157, 8-14.
- MacKown, C. T., Volk, R. J., Jackson, W. A. 1981. Nitrate accumulation, assimilation and transport by decapitated corn roots. *Plant Physiol.* 68, 133-138.
- Morgan, M. A., Jackson, W. A., Volk, R. J. 1985. Concentration dependence of the nitrate assimilation pathway in maize roots. *Plant Sci.* 38, 185-191.
- Muller, B., Touraine, B. 1992. Inhibition of  $\text{NO}_3^-$  uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. *J. Exp. Bot.* 43, 617-623.
- Muller, B., Tillard, P., Touraine, B. 1995. Nitrate fluxes in soybean seedling roots and their response to amino acids: an approach using  $^{15}\text{N}$ . *Plant Cell Environ.* 18, 1267-1279.
- Rocher, J. P. 1984. Transport des assimilats. Analyse compartimentale de la migration des assimilats. Application à la comparaison de huit génotypes au stade jeune. In: Gallais, A., (Coord.), *Physiologie du maïs. Communications au Colloque Physiologie du Maïs*. Royan, INRA, Paris, pp. 321-330.
- Ryan, J., El Gharous, M., Nsarellah, N. 1994. Nitrogen application timing for dry land

- moroccan cereals. *AL Awamia* 85, 15-23.
- Scheurwater, I., Clarkson, D. T., Purves, J. V., van Rijt, G., Saker, L. R., Welschen, R., Lambers, H. 1999. Relatively large nitrate efflux can account for the high specific respiratory costs for nitrate transport in slow-growing grass species. *Plant Soil* 215, 123-134.
- Shaner, D. L., Boyer, J. S. 1976. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. Regulation by nitrate flux at low leaf water potential. *Plant Physiol.* 58, 505-509.
- Tahri, E., Kejiou, M., Dahmani, Y., Belabed, A. 1998. Impact du stress hydrique sur le pouvoir tampon de deux variétés de blé tendre. In: El Mtili, N., (Ed.), *Act. J. Sc. sur le Blé Oujda, Maroc*, pp. 56-61.
- Talouizte, A., Moyse, A., Champigny, M. L. 1989. Bases physiologiques de la nutrition nitrique des végétaux supérieurs. I. Absorption de  $\text{NO}_3^-$ . *Ann. Biol.* 28, 233-254.
- Talouizte, A., Moyse, A., Champigny, M. L. 1990. Bases physiologiques de la nutrition nitrique des végétaux supérieurs. II. Contrôle de l'absorption des ions nitriques. *Ann. Biol.* 29, 217-234.
- Talouizte, A., Bismuth, E., Ouhmidou, B., Moyse, A., Champigny, M. L. 1986. Root endogenous carbohydrate and nitrate utilization by wheat seedlings. *Life Sciences Advances (Plant Physiology)* 5, 74-79.
- Talouizte, A., Guiraud, G., Moyse, A., Marol, C., Champigny, M. L. 1984. Effect of previous nitrate deprivation on  $^{15}\text{N}$ -nitrate absorption and assimilation by wheat seedlings. *J. Plant Physiol.* 116, 113-122.
- Ter Steege, M. W., Stulen, I. 1997. A theoretical model for explaining the effect of physical manipulation on nitrate uptake in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Russian J. Plant Physiol.* 44, 500-504.
- Ter Steege, M. W., Stulen, I., Wiersema, P. K., Posthumus, F., Vaalburg, W. 1999. Efficiency of nitrate uptake in spinach: impact of external nitrate concentration and relative growth rate on nitrate influx and efflux. *Plant Soil* 208, 125-134.
- Ter Steege, M. W., Stulen, I., Wiersema, P. K., Paans, A. J. M., Vaalburg, W., Kuiper, P. J. C., Clarkson, D. T. 1998. Growth requirement for N as a criterion to assess the effects of physical manipulation on nitrate uptake fluxes in spinach. *Physiol. Plant.* 103, 181-192.
- Touraine, B., Grignon, N., Grignon, C. 1988. Charge balance in  $\text{NO}_3^-$ -fed soybean. Estimation of  $\text{K}^+$  and carboxylate recirculation. *Plant Physiol.* 88, 605-612.
- Touraine, B., Muller, B., Grignon, C. 1992. Effect of phloem-translocated malate on  $\text{NO}_3^-$

- uptake by roots of intact soybean plants. *Plant Physiol.* 99, 1118-1123.
- Umbreit, W. W., Burris, R. H., Stauffer, J. F. 1959. *Manometric techniques*, 4 th Ed. Burgess, Publ. Comp. Mineapolis USA.
- Wallace, W. 1986. Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and a comparison with wheat. *Physiol. Plant.* 66, 630-636.

## **CHAPITRE 4**

**Salts in the root zone affect NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N losses from wheat root in light:  
Influence of genotype and darkness**

Mohammed BenDriss Amraoui, Asmae Malali, and Ahmed Talouizte

Laboratory of plant physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar el Mehraz,  
P.O. Box 1796, Atlas, Fès, Morocco

Les résultats de ce chapitre sont présentés tels qu'ils ont été publiés dans Cereal Research  
Communications, Volume 28, Numéro 4, pp. 379-386 (2000).

Corresponding author: BenDriss Amraoui Mohammed, Laboratoire de Physiologie végétale,  
Département de Biologie, Faculté des Sciences Dhar el Mehraz B.P. 1796, Atlas, Fès, Maroc.

Telephone & Fax: (212) 055-73-29-81

E-mail: msms\_60@hotmail.com

### Résumé

L'influence des sels, de la lumière et l'obscurité sur la perte de  $\text{N-NO}_3^-$  a été étudié sur quatre variété marocaines de blé (*Triticum aestivum* L. var. Achtar, Saâda, Saba et Tegye32). A la lumière, les pertes de  $\text{N-NO}_3^-$  dans l'eau étaient relativement semblables chez toutes les variétés. Les sels à la lumière réduisent la perte de nitrate à partir des racines de Achtar, Saâda et Tegye32, et l'augmentent à partir des racines de Saba, comparés à l'eau durant 8 h. A l'obscurité, les sels réduisent la perte de nitrate à partir des racines de Achtar durant 8 h, mais l'augmentent à partir des racines de Saâda (6 h), Saba (8 h) et Tegye32 (4 h) comparés à l'eau. Les sels à l'obscurité augmentent les pertes de nitrate relativement à la lumière chez Saâda, et Tegye32 (8 h), chez Saba (pour 2 h) et Achtar (après 6 h). D'autre part, l'effet stimulateur de l'eau est favorisé lentement pour toutes les variétés à l'obscurité comparée à la lumière. Nos résultats suggèrent l'existence d'une variabilité génétique dans la relation entre les sels et la perte de nitrate qui dépend de la lumière. Dans cette étude, les différences variétales en pertes de  $\text{N-NO}_3^-$  sont discutées.

**Mots clés:** lumière; efflux du nitrate; sels; blé

### Abstract

The influence of salts, light and darkness on root  $\text{NO}_3^-$ -N loss has been studied on four varieties of Moroccan wheat (*Triticum aestivum* L. var. Achtar, Saâda, Saba and Tegye32). In light,  $\text{NO}_3^-$ -N losses in water were relatively similar in all varieties. Salts in light reduced nitrate loss from roots of Achtar, Saâda and Tegye32, and increased from roots of Saba, as compared to water, during 8 h. In the dark, salts reduced nitrate loss from roots of Achtar during 8 h, but increased from roots of Saâda (6 h), Saba (8 h) and Tegye32 (4 h) as compared to water. Salts in the dark increase nitrate losses relative to light in Saâda, and Tegye32 (8 h), in Saba (for 2 h) and in Achtar (after 6 h). On the other hand, the increasing effect of water developed slowly in the dark period for all varieties as compared to light. Our result suggests the existence of genetic variability in the relation between salts and nitrate loss which depends on light. In this study, the varietal differences in the root losses of  $\text{NO}_3^-$ -N is discussed.

**Key words:** Light; nitrate efflux; salts; wheat

## Introduction

$\text{NO}_3^-$  is a widespread water pollutant in many agricultural regions (McLay et al., 1991) where it is the principal source of nitrogen for plant growth (Kleinhofs and Warner, 1990). Nitrate losses in the plant root zone from root are probably less than leaching losses, but are important because of the minimal concentrations required to support eutrophication (0.3 mg/l: Sawyer, 1947). High rainfall and/or irrigation on well-drained agricultural soils, especially sandy soils, can lead to extensive nitrate movement below the plant root zone (Hubbard et al., 1989) and cause toxicity problems for the consumer (methemoglobinemia) if  $\text{NO}_3^-$  concentration in water exceeds the drinking water standard (Willis et al., 1997). The application of modern agronomical techniques allows already to reduce losses of nitrate considerably (Leterme et al., 1997). However, in case of cultures whose levying and stocking capacities of nitrogen are low, a low contribution of nitrogenous fertilizer can be behind remainders of important mineral nitrogen in superficial layers of the ground driving to an increase of risks of N losses by leakage (Simon and Le Corre, 1992). Thus, in the future, means of action would have to be essentially turned to the genetics to drive to the elaboration of thriftier varieties in nitrogen which are more efficient in nitrate use. At the present time, a better way to avoid the waste of fertilizer and  $\text{NO}_3^-$  pollution is the use of varieties that are efficient in capture and stocking of nitrate. Thus, investigations of the physiological effects of some environmental factors on  $\text{NO}_3^-$  losses may provide information for new strategies of varietal selection adapted to appropriated technical itineraries. Unfortunately, in our country, few studies (M'sehli, 1999) on  $\text{NO}_3^-$  pollution have been performed under field or controlled conditions with Moroccan wheat varieties. For this reason and so as to better know capacities of nitrate stocking of some Moroccan varieties we will study the effect of some environmental factors on  $\text{NO}_3^-$ -N loss from four wheat varieties: Achtar, Saâda, Saba and Tegye32, which are more important in Morocco. The aim of the present paper was to examine the effect of salts alone or in combination with darkness on  $\text{NO}_3^-$ -N losses from roots of Moroccan wheat varieties.



## Materials and methods

### Plant material and growing conditions

Wheat seeds (*Triticum aestivum* L., var. Achtar, Saâda, Saba and Tegyey32) disinfected for 5 min in sodium hypochlorite (37 g/l) were soaked for 8 h in distilled water and then allowed to germinate for 6 days on moist cheesecloth in darkness at 18 to 20 °C. Seedlings were planted in groups of 25 in plastic holders and placed in 5 litres  $\text{NO}_3^-$  solution. The  $\text{NO}_3^-$  solution at pH 5.5 contained 3 mM  $\text{KNO}_3$ , 2.5 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.75 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 mM  $\text{NaCl}$ , 0.75 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 6  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 48.5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 16.5  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0.5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . Iron was added as 10 mg of  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA per litre of  $\text{NO}_3^-$  solution. Solutions were constantly aerated and changed every three days. Growth was carried out in controlled chamber where light was applied during a 16 h photoperiod by white fluorescent bulbs (mixolamp 160W) and tubes (40W) to give 2000 lux at pot level. Temperature was maintained at 21°C in light period and 18°C in dark period. Relative humidity was about 65%.

### Plant treatments

On the 21<sup>th</sup> day after soaking, 3 h after the start of the light period, four intact plants roots of each variety were rinsed three times with distilled water and placed under light or dark conditions in a test tube containing 40 ml of distilled water or 40 ml of salt solution, at pH 5.5, similar to the complete nutrient solution except that 3 mM  $\text{KCl}$  and 2.5 mM  $\text{CaSO}_4$  were used to replace the nitrate salts. The solutions were constantly aerated. At the end of the first hour, the roots were placed in another 40 ml of the identical solution for 1 h. The sequence was continued through 2-8 h and the medium was changed every two hours. At the end of the experimental period (8 h), the seedlings were removed; roots and shoots were excised, dried and weighed. Tissue nitrate and soluble sugars before transfer of seedlings (at 0 h) to bathing solution were extracted from roots and shoots separately with cold methanol: chloroform:  $\text{H}_2\text{O}$  (12: 5: 3 v/v/v).  $\text{NO}_3^-$ -N leaked out from the roots to the solutions at different times were concentrated separately in 2 ml of distilled water and determined together with tissue nitrate according to the method of Cataldo et al. (1975). Soluble sugar was assayed by the anthrone method (Halhoul and Kleinberg, 1972). To estimate the transpiration, four plants were placed in test tube containing 40 ml of salt solution. Then, solution was hermetically sealed to avoid water losses by evaporation. Transpiration was determined from variation of weight of plant-solution system during the experimental period (8 h). At the end of experiment, total leaf area of each plant was measured with an image

analyser. For each of the four varieties four repetitions (each of four plants) were realized for each of the four treatments. For each repetition five determinations were made during the time with the same plants. In the Figures, nitrate loss is given in  $\mu\text{g NO}_3^-$ -N loss per root dry weight and soluble sugar in  $\mu\text{g}$  of glucose equivalents per gram dry weight. The data were analysed by ANOVA (analysis of variance) to prove the significant difference between varieties and between treatments. Standard errors were calculated for all means and where no error bars appear, the standard error falls within the size of the symbol.

## Results and discussion

Nitrate is not only reduced, it may be also exported in the xylem, accumulate in, and/or leak out from the root tissues to the soil (Grignon et al., 1997). Many studies have been reported on  $\text{NO}_3^-$  losses from root and on the effects of environmental factors on this process (Minotti et al., 1968; Scaife and Schloemer, 1994; Aslam et al., 1995), but little information is available on the genetic variability in  $\text{NO}_3^-$  losses from roots and neither the mechanism nor the physiological significance of nitrate efflux is currently well understood (Kleinhofs and Warner, 1990). However, as it was reported for nitrate reduction and for its partitioning between root and shoot by Andrews (1986) and for  $\text{NO}_3^-$  efflux by Aslam et al. (1995), it's possible that  $\text{NO}_3^-$  losses may vary with species and also from a variety to another and probably may be also influenced by the growth rate and the size of seedlings depending essentially on nitrate metabolization and translocation from roots.

Efflux from roots following transfer to nitrate-free medium was very variable and was found to depend on variety and treatment (Fig. 1). In general, cumulative nitrate efflux increases gradually in water during the experimental period, whereas in salts it increases less intensively. A net nitrate efflux could be detected after nitrate removal with the largest efflux occurring during the first 2 h. Then, it decreases and becomes low after this time. This decline is due probably to diminution of cytoplasmic nitrate pool in the roots because it is small relative to the vacuole and the efflux from the vacuole into the cytoplasm is slower than efflux from the cytoplasmic pool into the external medium (Kleinhofs and Warner, 1990). It may be also due to inactivation or degradation of the membrane protein responsible for nitrate efflux as reported by Van der Leij et al. (1998).

Since the apoplastic N release precedes that of the cytoplasmic pool and the cytoplasmic pool may be replaced completely after 34 min as observed by Deane-Drummond and Glass (1982) in barley, the apoplastic N release may occur certainly here before or during 34 min and thus may not be estimated here even from data of the first hour. In salts, nitrate loss was stimulated for Saba (in light and dark) and reduced for Achtar (in light and dark), Saâda and Tegye32 (in light). Furthermore, we found typical effects of dark on nitrate efflux only for Saâda in salts and Tegye32 in all solutions, but for Achtar and Saba dark has no effects on nitrate efflux for both mediums. This suggests that nitrate efflux channels are not only under the control of light and photosynthesis via nitrate reduction in saline environment, but may also depend on salinity and variety as it has been found for pH by Aslam et al. (1995) who have reported that the conditions under which nitrate efflux

channels open and close vary with the species.

In light, roots lost similar amount of  $\text{NO}_3^-$ -N during the first hour and the last 7 hours in all solutions for all varieties, except for Saba in salts (Figs. 2A and 2B). However, for both periods, there were no significant differences in  $\text{NO}_3^-$ -N losses in water between the varieties, except between Saâda and Tegye32 in the first hour, whereas in salts, Saba lost significantly more  $\text{NO}_3^-$ -N than the other varieties and Saâda lost more  $\text{NO}_3^-$ -N than Achtar and Tegye32 (Figs. 2A and 2B). Salts reduced significantly nitrate loss from roots of Achtar and Tegye32 during the experiment, but increased significantly this parameter for Saba, as compared with water, especially in the last 7 hours of treatment. In Saâda, salts reduced nitrate loss relative to water during the experiment (Fig. 1), but nitrate loss in salts did not differ from that in water at the last 7 hours (Fig. 2B). It was due to the fact that in Saâda after the first hour  $\text{NO}_3^-$  loss increased at similar rate in both mediums during the remainder of experiment (Figs. 1 and 2A).

This varietal difference in  $\text{NO}_3^-$ -N loss in salts may be due to differences in the effects of salts on factors which are involved in the control of influx and efflux of  $\text{NO}_3^-$ , and whose effects on nitrate flux have been amply demonstrated by several authors (Minotti et al., 1968; Jackson et al., 1976; Kleinhofs and Warner, 1990; Aslam et al., 1995; Grignon et al., 1997). For example, the increases of nitrate reductase activity, which are associated with high ionic strength (Champigny, 1995), may vary with genotypes and so may produce variation in nitrate loss. Since efflux is a function of internal  $\text{NO}_3^-$  concentration (Aslam et al., 1995), it follows that these differences may be due to varietal variation in internal  $\text{NO}_3^-$ . Before transfer (at 0 h) of seedlings to bathing solution, neither root  $\text{NO}_3^-$  nor root soluble sugar concentration vary significantly among varieties (Fig. 3) and no one may reflect variation of  $\text{NO}_3^-$  loss found between our varieties. Initial nitrate concentration did not give an indication of the nitrate efflux, because small increase in root nitrate may be associated with a marked increase in nitrate efflux, as reported by Jackson et al. (1976). This suggests that probably little if any changes in nitrate reductase activity in response to removal of nitrate supply will occur during the 8 h of experiment.

It is well documented that mineral ions such as  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$  in addition to the amount of phytohormones, are involved in the regulation of water flux through the plant (Gollan et al., 1992; Barthes et al., 1996). In the absence of ions, water flux and probably transpiration were considerably reduced (Barthes et al., 1996). But, the changes in the hydraulic conductivity and hence transpiration rate, which are associated with nutrient starvation, appear after several days (Carvajal et al., 1996) and so are unlikely to be important here

during 8 h and may not reflect varietal difference in  $\text{NO}_3^-$ -N loss noted here. Nevertheless, in the Figure 4, which shows leaf area and transpiration rate of seedlings in salts after nitrate removal, transpiration rate is different from variety to another in spite of a similarity in leaf area. Transpiration of Tegye32 was higher than those of Achtar, Saâda and Saba. Tegye32 transpires highly and loses low amount of nitrate, whereas Saâda and Saba transpire weakly and lost high amount of nitrate and Achtar transpires weakly, just as Saâda and Saba, but loses low quantity of nitrate compared to Saâda and Saba (Figs. 1 and 4), indicating that nitrate loss is not entirely a function of transpiration and water use efficiency. Recently, it has been determined that variations of nitrate uptake during a 24 h dark/light cycle are not due to variations of transpiration (Le Bot and Kirkby, 1992; Delhon et al., 1995) but are attributed to diurnal variation of nitrate reduction (Scaife and Schloemer, 1994). Furthermore, Delhon et al. (1995) have reported that the upholding of transpiration at constant level doesn't abolish inhibition of net nitrate uptake (i.e. decreased influx and/or enhanced efflux) in dark, although it decreases both accumulation of nitrate and reduced nitrogen in the root, indicating that transpiration may affect nitrate uptake only via nitrate efflux. In our opinion, the changing levels of transpiration and nitrate reduction - both singly and/or in interaction - affect nitrate loss, but the contribution of each of the two processes to variation of nitrate loss, which vary probably widely with genotype, may not be determined here.

Nevertheless, this contrasting nitrate-N release in salts can be due to different membrane stability of the roots cells in the individual genotypes, according to their salt tolerance. The magnitude of salt tolerance of the root cells would be dependent upon factors and processes which are involved in salts uptake (for more details see Yeo, 1994). If the plant has a large capacity for nutrient acquisition combined with high selectivity between  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  uptake may be restricted (i.e. reduced influx and/or increased efflux of  $\text{Cl}^-$ ) by  $\text{NO}_3^-$  flux differences (i.e. enhanced influx or decreased efflux of nitrate) across the plasma membrane as reported for instance between potassium and sodium by Hasegawa et al. (1994). In our work, since all experiments are achieved in nitrate free-solution, it follows that restriction of  $\text{Cl}^-$  uptake may occur here only by a decline of nitrate efflux. Decreased nitrate efflux of Achtar and Tegye32 roots may be originated from restriction of  $\text{Cl}^-$  uptake in comparison to Saba and Saâda roots. On the other hand, since 3 mM  $\text{KNO}_3$  and 2.5 mM  $\text{Ca(NO}_3)_2$  were replaced by 3 mM  $\text{KCl}$  and 2.5 mM  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{Cl}^-$  uptake may increase and  $\text{Cl}^-$  may replace rapidly nitrate in the xylem as suggested by Van der Leij et al. (1998) and so may increase more nitrate loss (as for Saba and Saâda) by diminution of nitrate translocation from roots. More detailed analysis of  $\text{Cl}^-$  in the root medium (water, salts) is needed to

investigate this possibility.

In the dark,  $\text{NO}_3^-$ -N loss in salts in contrast to water increased rapidly for all varieties, except for Achar (Figs. 1, 2C and 2D). In the first hour, as compared to water, salts increase significantly  $\text{NO}_3^-$ -N loss from Saâda, Saba and Tegye32, but don't affect that from Achar which remains significantly low (compared to Saâda, Saba and Tegye32, Fig. 2C). During the last 7 hours, salts reduced significantly  $\text{NO}_3^-$ -N loss from all varieties as compared with water (Fig. 2D). It was due to an increase and a decrease of N-loss, respectively, in water and salts (compared to the first hour) for Saâda, Saba and Tegye32 and only to an increase of loss in water for Achar (Figs. 2C and 2D). Since nitrate efflux in salts from Saâda, Saba and Tegye32, in contrast to Achar, decreases rapidly after the first hour and becomes low in the last 7 hours (Figs. 2B, 2C and 2D) Saba's salty roots appear to have lost more nitrate in light than in dark in the last 7 hours because they have lost in dark nearly all of their cytoplasmic nitrate pool in the first hour. Deng et al. (1990) have reported that the activity and synthesis of nitrate reductase protein are driven by circadian rhythms which lead to transitory nitrate accumulation during dark period and thus to an increase of nitrate loss. The increases in the amount of  $\text{NO}_3^-$ -N release in dark for both mediums may arise from an energy (ATP, NADH, sucrose) alteration that may decrease nitrate reduction and translocation from roots to shoots. It may also due to dark inactivation of nitrate reductase protein by phosphorylation as reported by MacKintosh et al. (1995) and perhaps weakly to diminution of transpiration in dark. However, the largest increases in the rate of  $\text{NO}_3^-$ -N release by salts for Saâda, Saba and Tegye32 may result also from this changes, but the reasons for the existence of rate nitrate loss differences between salts and water are not understood and could result from the presence of magnesium salts in the medium which may affect the maximal rate of reaction of NR inactivation in dark (MacKintosh et al., 1995; Faure et al., 1997). On the other hand, the contrasting nitrate-N release between Achar and the other varieties in salts-dark treatment is due neither to internal nitrate concentration nor to transpiration but may be caused by differences in: (a)  $\text{NO}_3^-$ -N accumulation in cell free space and cell wall, as reported by Minotti et al. (1968) and Touraine and Grignon (1981) (b) root apoplastic water fraction, which vary widely with species and varieties (Gunasekera and Berkowitz, 1992) (c) the response of NR activity (Champigny, 1995) and xylem translocation (Hoarau et al., 1996; Barthes et al., 1996) to salts (d) maintenance of fast nitrate transport, reduction and retention in roots by carbohydrate reserves as has been pointed out by Touraine and Grignon (1981) and Talouizte et al. (1987). Further studies are needed to elucidate these assumptions to understand well how salts affect nitrate loss and how these varietal differences in nitrate

leakage and perhaps in salt tolerance exist. Nevertheless, if one wishes to select for improved plant performance (in nitrate use and stoking), interactions between water and nitrate use and between nitrate loss and salt uptake should be studied in saline environment. Research into these interactions may help to select and elaborate efficient genotypes in nitrate use, which may contribute mainly to prevent nitrate pollution and safeguard our environment.

## References

- Andrews, M. 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell Environ.* 9, 511-519.
- Aslam, M., Travis, R. L., Huffaker, R. C. 1995. Effect of pH and calcium on short-term  $\text{NO}_3^-$  flux in root of barley seedling. *Plant Physiol.* 108, 727-734.
- Barthes, L., Deléens, E., Bousser, A., Hoarau, J., Prioul, J.-L. 1996. Nitrate use and xylem exudation in detopped wheat seedlings: an early diagnosis for predicting varietal differences in nitrogen utilisation? *Aust. J. Plant Physiol.* 23, 33-44.
- Carvajal, M., Cooke, D. T., Clarkson, D. T. 1996. Plasma membrane fluidity and hydraulic conductance in wheat roots- interactions between root temperature and nitrate or phosphate deprivation. *Plant Cell Environ.* 19, 1110-1114.
- Cataldo, D. A., Haroon, M., Schrader, L. E., Youngs, V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6, 71-80.
- Champigny, M. L. 1995. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. *Photosynthesis Research* 46, 117-127.
- Deane-Drummond, C. E., Glass, A. D. M. 1982. Nitrate uptake into barley (*Hordeum vulgare*) plants: a new approach using  $^{36}\text{ClO}_3^-$  as an analog for  $\text{NO}_3^-$ . *Plant Physiol.* 70, 50-54.
- Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., Passama, L. 1995. Diurnal regulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake in soybean plants. I. Changes in  $\text{NO}_3^-$  influx, efflux, and N utilization in the plant during the day/night cycle. *J. Exp. Bot.* 46, 1585-1594.
- Deng, M. D., Moureaux, T., Leydecker, M. T., Caboche, M. 1990. Nitrate-reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. *Planta* 180, 281-5.
- Faure, J. D., Meyer, C., Caboche, M. 1997. Assimilation du nitrate: nitrate et nitrite réductases. In: Morot-Gaudry, J.-F., (Ed.), Assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique, biochimique et moléculaire. INRA, Paris, pp. 45-65.
- Gollan, T., Schurr, U., Schulze, E.-D. 1992. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in, and pH of, the xylem sap. *Plant Cell Environ.* 15, 551-559.
- Grignon, C., Thibaud, J.-B., Lamaze, T. 1997. Transport du nitrate par la racine. In: Morot-Gaudry, J.-F., (Ed.), Assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique,



- biochimique et moléculaire. INRA, Paris, pp. 27-43.
- Gunasekera, D., Berkowitz, G. 1992. Evaluation of contrasting cellular-level acclimation responses to leaf water deficits in three wheat genotypes. *Plant Sci.* 86, 1-12.
- Halhoul, M. N., Kleinberg, I. 1972. Differential determination of glucose and fructose, and glucose and fructose yielding substances with anthrone. *Ann. Biochem.* 50, 337-343.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Nelson, D. E., Samaras, Y., Rhodes, D. 1994. Tissue culture in the improvement of salt tolerance in plants. In: Yeo, A. R., Flowers, T. J., (Eds), *Soil mineral stresses. Approaches to crop improvement. Monographs on Theoretical and Applied Genetics.* Vol. 21. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 83-125.
- Hoarau, J., Barthes, L., Bousser, A., Deléens, E., Prioul, J.-L. 1996. Effect of nitrate on water transfer across roots of nitrogen pre-starved maize seedlings. *Planta* 200, 405-415.
- Hubbard, R. K., Williams, R. G., Erdman, M. D. 1989. Chemical transport from coastal plain soils under simulated rainfall: Surface runoff, percolation, nitrate, and phosphate movement. *Trans. Am. Soc. Agric. Engrs.* 32, 1239-1249.
- Jackson, W. A., Kwik, K. D., Volk, R. J., Butz, R. G. 1976. Nitrate influx and efflux by intact wheat seedlings: effect of prior nitrogen nutrition. *Planta* 132, 149-156.
- Kleinhofs, A., Warner, R. L. 1990. Advances in Nitrate Assimilation. In: Mifflin, B. J., Lea, P. J., (Eds), *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Intermediary nitrogen metabolism.* Vol.16. Academic Press, pp. 89-120.
- Le Bot, J., Kirkby, E. A. 1992. Diurnal uptake of nitrate and potassium during the vegetative growth of tomato plants. *J. Plant Nutr.* 15, 247-264.
- Leterme, P., Morvan, T., Poulain, D. 1997. Azote et pollution. In: Morot-Gaudry, J.-F., (Ed.), *Assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique, biochimique et moléculaire.* INRA, Paris, pp. 381-401.
- MacKintosh, C., Douglas, P., Lillo, C. 1995. Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant Physiol.* 107, 451-457.
- McLay, C. D. A., Cameron, K. C., McLaren, R. G. 1991. Effect of time of application and continuity of rainfall on leaching of surface-applied nutrients. *Aust. Soil Res.* 29, 1-9.
- Minotti, P. L., Williams, D. C., Jackson, W. A. 1968. Nitrate uptake and reduction as affected by calcium and potassium. *Soil Sci. Amer. Proc.* 32, 692-698.
- M'sehli, D. 1999. Impact de l'irrigation de complément par les eaux usées épurées par infiltration-percolation sur une culture de blé dur (*Triticum durum*) variété Karim. Tesi

- Master of Science n° 189, CIHEAM, Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari.
- Sawyer, C. N. 1947. Fertilization of lakes by agricultural and urban drainage. J. New England Water Works Assoc. 61, 109-127.
- Scaife, A., Schloemer, S. 1994. The diurnal pattern of uptake and reduction by spinach (*Spinacia oleracea* L.). Ann. Bot. 73, 337-343.
- Simon, J.-C., Le Corre, L. 1992. Fertilisation annuelle et lessivage de l'azote nitrique. Fourrages 129, 3-10.
- Talouizte, A., Bismuth, E., Ouhmidou, B., Moyse, A., Champigny, M. L. 1987. Root endogenous carbohydrate and nitrate utilization by wheat seedlings. Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 6, 79-84.
- Touraine, B., Grignon, C. 1981. Les fonctions de transport de la racine II. Les fonctions d'exportation. Physiol. Vég. 19, 581-610.
- Van der Leij, M., Smith, S. J., Miller, A. J. 1998. Remobilisation of vacuolar stored nitrate in barley root cells. Planta 205, 64-72.
- Yeo, A. 1994. Physiological criteria in screening and breeding. In: Yeo, A. R., Flowers, T. J., (Eds), Soil mineral stresses. Approaches to crop improvement. Monographs on Theoretical and Applied Genetics. Vol. 21. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 37-59.
- Willis, G. H., Southwick, L. M., Fouss, J. L., Carter, C. E., Rogers, J. S. 1997. Nitrate losses in runoff and subsurface drain effluent from controlled-water-table plots. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58, 566-573.

## **PARTIE III**

### **CONCLUSION GENERALE**

L'objectif majeur de ce travail est la description des potentialités physiologiques de quatre variétés marocaines de blé tendre. L'étude du métabolisme de l'azote et du métabolisme du carbone m'est parue nécessaire du fait de leurs importances dans la croissance du végétal. L'étude de l'utilisation du nitrate a en particulier retenu mon attention pour deux raisons. La première c'est parce qu'elle constitue l'étape clé du métabolisme de l'azote (Solomonson et Barber, 1990; Campbell, 1999); et la seconde c'est parce que le nitrate affecte beaucoup le métabolisme du carbone et la croissance (Stitt et Steup, 1985; Pollock et Cairns, 1991; Van Quy et al., 1991; Van Quy et Champigny, 1992; Huppe et Turpin, 1994; Champigny, 1995; Améziane et al., 1997; Limami et Améziane, 1997; BenDriss Amraoui et Talouizte, 2001). Notre curiosité a été stimulée par l'existence de lacunes considérables dans nos connaissances fondamentales sur les processus d'acquisition du nitrate, en particulier l'efflux du nitrate.

La présentation adoptée pour ce travail m'a conduit à discuter les résultats à la fin de chacun des chapitres. Je ne retiendrai donc dans ces conclusions générales que les données permettant de dégager certaines particularités du métabolisme des variétés de blé étudiées.

L'examen des résultats relatifs à la croissance indique que les variétés se distinguent les unes des autres. Saâda, Saba et Tegye32 se différencient de la variété Achtar par une élévation foliaire plus importante. En revanche, Achtar et Saba possèdent une surface foliaire similaire et élevée comparées à Saâda et Tegye32. Saâda et Tegye32 présentent des surfaces foliaires similaires. A l'opposé de la partie aérienne, l'examen des racines montre que la variété Achtar se distingue par un système racinaire plus long que les autres variétés (résultats non présentés).

L'accumulation des nitrates prédomine dans la partie aérienne par rapport aux racines. Elle est importante chez Tegye32 par rapport aux autres variétés. L'analyse de l'azote organique montre que le modèle de répartition de l'azote organique entre la forme soluble et insoluble des feuilles et des racines est similaire chez les variétés Achtar, Saâda, et Tegye32. Par contre, la variété Saba se distingue de ces variétés par un modèle de répartition de l'azote organique entre la forme soluble et la forme insoluble différent, suggérant une protidogenèse foliaire accrue au dépend des racines chez cette variété (azote soluble faible et azote insoluble élevé).

La répartition des sucres entre la forme soluble et insoluble dans les racines et dans la partie aérienne diffère d'une variété à une autre. Saba accumule plus de sucres insolubles dans les racines et la partie aérienne et plus de sucres solubles seulement dans la partie aérienne que Achtar, tandis que Saâda et Tegye32 accumulent des quantités intermédiaires.

La faible proportion des sucres solubles notée dans les racines de Saba (soluble: 2.8% et insoluble: 97.2%) par rapport aux autres variétés est en faveur de l'existence d'une protidogenèse foliaire accrue comme on l'a montré dans l'analyse des différentes formes d'azote chez cette variété. Ceci suggère aussi une faible translocation des sucres vers les racines.

Le fait que la variété Achtar possède une teneur en azote réduit soluble semblable à celle de Saâda et Tegye<sup>32</sup> et supérieure à celle de Saba, et présente dans sa partie aérienne les plus faibles teneurs en nitrates et en sucres solubles comparée aux autres variétés montre l'existence d'une différence entre ces variétés dans l'assimilation des nitrates et sa répartition entre les racines et les feuilles. Ceci suggère une variation variétale dans la translocation des glucides vers les racines associée à une variation variétale dans la translocation de nitrates vers les feuilles. D'autre part, bien que les variétés présentent une similitude dans l'absorption des nitrates, la variété Achtar assimile plus de nitrates que les autres variétés au cours d'une période d'absorption de 8 h. Ces observations sont en faveur d'une importante assimilation des nitrates dans les feuilles et/ou un important transport d'azote réduit vers la partie aérienne associé à une importante assimilation dans les racines chez la variété Achtar. Toutefois, le fait que Achtar accumulent plus de sucres solubles dans ces racines et moins de nitrates et sucres solubles dans sa partie aérienne que Saba est en faveur de la seconde hypothèse et suggère une importante translocation des glucides vers les racines associée à une faible translocation de nitrates vers les feuilles chez Achtar.

Les faibles quantités de nitrates absorbés ainsi que les faibles différences variétales relatives à l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  nous a poussé à vérifier si l'efflux du nitrate se comporte comme l'absorption nette, résultante de l'influx et de l'efflux, malgré que les variétés diffèrent dans l'assimilation de  $\text{NO}_3^-$ , le modèle de répartition de l'azote et du carbone entre la forme soluble et insoluble et dans la croissance de la partie aérienne.

Les résultats présentés dans le chapitre 4 montre que l'efflux est stimulé à l'obscurité chez toutes les variétés par rapport à la lumière. Cet effet est rapide sur sels et lent sur eau distillée. Ceci suggère une activation des systèmes de l'efflux par les ions de la solution associée probablement à l'inactivation de la NR à l'obscurité. A la lumière, les pertes de  $\text{NO}_3^-$  dans l'eau sont relativement semblables chez toutes les variétés, par contre sur sels elles sont réduites chez Achtar, Saâda et Tegye<sup>32</sup>, et stimulées chez Saba, comparés à l'eau. A l'obscurité, les sels réduisent l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  chez Achtar, mais l'augmentent chez Saâda, Saba et Tegye<sup>32</sup>, comparés à l'eau. Ces résultats suggèrent l'existence d'une variabilité génétique dans la relation entre les sels et l'efflux du nitrate qui dépend de la lumière. Ils

montrent également que l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  de la variété Saba est sensible aux sels (stimulé à la lumière et à l'obscurité) par rapport à celui de la variété Achtar (réduit à la lumière et à l'obscurité), tandis que le système de l'efflux de Saâda et Tegye32 montre un comportement intermédiaire (réduit à la lumière et stimulé à l'obscurité). Ces différences entre variétés ont été expliquées par des différences dans la stabilité membranaire des cellules racinaires aux sels ainsi que dans la réduction des nitrates et la translocation de l'azote vers les feuilles. Le comportement opposé des variétés Achtar et Saba quant à l'efflux sur sels est en accord avec les différences variétales dans l'assimilation et la translocation des nitrates reportées en haut et suggèrent que la variété Achtar a un influx plus faible que celui de Saba du fait que les deux variétés ne se distinguent pas dans leur absorption nette de nitrate. Chez l'épinard, les signaux reliés à la VCR détermine d'une manière prédominante les flux de nitrates. A une VCR élevée ( $0.25 \text{ g.g}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ ), l'influx du nitrate est de 20 à 40% plus faible et l'efflux de nitrate est de 50 à 70% plus faible qu'à une faible VCR ( $0.17 \text{ g.g}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ ) (Ter Steege et al., 1999). Le rapport efflux/influx diminue de 0.5 à faible VCR à 0.2 à une VCR élevée. Nos résultats montrent que chez le blé tendre l'influx et l'efflux varient dans le même sens comme chez l'épinard et suggèrent selon les observations de Ter Steege et al. (1999) une VCR plus élevée chez Achtar que chez Saba.

La comparaison de l'efflux du  $\text{NO}_3^-$  en présence et en absence de KCl confirme le comportement du système de l'efflux des variétés vis à vis des sels et montre que l'effet des sels observé précédemment est dû au KCl. Cet effet est dû à la présence simultanée de  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  car quand  $\text{K}^+$  est remplacé par  $\text{Ca}^{2+}$  l'effet de  $\text{Cl}^-$  tend à s'annuler. C'est donc un effet ionique généré par l'influx de  $\text{K}^+$  sur l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  impliquant l'influx de  $\text{Cl}^-$  et la lumière. Les différences variétales dans la réponse de l'efflux au KCl peuvent être expliquées par des différences d'absorption de  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  ou seulement de  $\text{Cl}^-$ . Selon la première hypothèse, Saba aurait la plus forte capacité d'absorption de  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$ , Achtar la plus faible et Saâda et Tegye32 une capacité intermédiaire. Le fait que la variété Achtar possède une importante activité peroxydase ionique racinaire, comparée à Saâda (Aouad et al., 1998), associée à une importante lignification et rigidification des parois cellulaires des racines (Olmos et al., 1994; Gossett et al., 1994) peut engendrer chez cette variété une stabilité membranaire élevée vis à vis des sels (faible absorption de  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) et expliquer la faible capacité d'efflux du nitrate chez cette variété. Selon la deuxième hypothèse, les différences variétales dans la réponse de l'efflux au KCl pourraient être dues à des différences de l'influx du  $\text{Cl}^-$  seulement. D'après plusieurs auteurs (Smith, 1973; Triplett et al., 1980; Siebrecht et Tischner, 1999) les anions organiques endogènes réduisent l'entrée de  $\text{Cl}^-$  dans la cellule et son transport vers les

feuilles. De ce fait, la réduction de l'exsorption du nitrate par le KCl chez Achtar pourrait être due à une diminution de l'influx de  $\text{Cl}^-$  causée par un important pool d'anions organiques racinaires qui, à la place de l'influx de  $\text{Cl}^-$ , compensent le manque d'équivalents en charge négative dans le cytosol et l'exsudat xylémique (ex.  $\text{K}^+$ -malate) provoqué par l'influx de  $\text{K}^+$  quand le  $\text{NO}_3^-$  n'est pas présent dans la solution.

Le traitement hypo-osmotique avec l'eau comparé à  $\text{CaCl}_2$  produit généralement une augmentation de l'efflux par élévation de la turgescence des cellules racinaires chez toutes les variétés, excepté chez Achtar à la lumière, suggérant que le canal de l'efflux du  $\text{NO}_3^-$  (Miller et Smith, 1996; Clarkson, 1998; Ter Steege et al., 1999) est aussi sensible à la turgescence (**chapitre 5**).

Cependant, quand l'efflux sur eau-lumière est comparé à celui sur eau-obscurité aucune différence n'est trouvée entre ces deux traitements chez toutes les variétés, excepté Tegye32, par contre si la même comparaison est faite pour l'efflux sur  $\text{CaCl}_2$ , d'importantes différences sont trouvées chez toutes les variétés, excepté Tegye32. Ceci montre une activation du système de l'efflux du nitrate et probablement une inhibition de la réduction du nitrate à la lumière, en particulier chez Saâda et Saba, par le traitement hypo-osmotique via une augmentation de la turgescence, comme a été démontré pour l'efflux du  $\text{K}^+$  et du saccharose (Walker et al., 2000). Ceci suggère que l'efflux du nitrate et probablement la réduction du nitrate sont impliqués dans la régulation de la turgescence.

Les variations de l'exsorption des sucres et des nitrates à faible et fort éclaircissements montrent l'existence d'une corrélation négative entre l'efflux du  $\text{NO}_3^-$  et des sucres et une étroite relation entre le système de l'efflux des sucres et l'assimilation du  $\text{NO}_3^-$ , indépendamment du statut carbone des plantes. Une faible disponibilité en  $\text{NO}_3^-$  réduit l'exsorption des sucres plus qu'un faible éclaircissement, indiquant que l'efflux des sucres est plus dépendant du nitrate que de l'export du carbone vers les racines. L'efflux des sucres est donc influencé par le statut nitrate et non par le statut carbone des plantes. Le fait que l'exsorption des sucres diminue malgré que la perte des nitrates augmente ou diminue indique que les deux types d'efflux impliquent des mécanismes différents. Ensemble, ces résultats démontrent l'existence d'une régulation de l'efflux du nitrate et des sucres par la lumière et la partie aérienne en interaction avec le nitrate et les processus de son assimilation.

La défoliation partielle ou totale et la décapitation ont aussi un effet sur l'exsorption des nitrates. Cet effet est spectaculaire chez Saâda et Saba, par contre, il est moins important chez Tegye32 et pratiquement inexistant chez Achtar, excepté la défoliation totale sur eau-lumière. Ces observations montrent que l'exsorption chez Achtar, au contraire des autres

variétés, est faiblement affectée par la partie aérienne et semble plutôt dépendante du système racinaire. Ceci est en accord avec un système racinaire plus développé et une partie aérienne courte chez cette variété par rapport aux autres variétés.

A l'inverse de Achtar et de Tegye32, la défoliation totale (racines excisées) et la décapitation diminuent fortement l'exsorption chez Saâda et Saba comparée au contrôle, tandis que la défoliation partielle (ablation des feuilles 1, 2 et 3) augmente significativement l'exsorption à la lumière (eau et sels) et la diminue à l'obscurité (eau et sels) chez Saâda. Chez Saba, la défoliation partielle n'affecte pas l'exsorption sur sel-lumière mais l'augmente sur eau-lumière. Sur sel-obscurité, elle diminue l'exsorption et sur eau-obscurité elle l'augmente. Ceci indiquent qu'en générale, les feuilles 1, 2 et 3 inhibent l'exsorption des nitrates (car elle augmente après leur ablation), par contre, la feuille 4 et l'apex la stimulent (car elle diminue après décapitation) par émission de signaux chimiques (acides organique, acides aminés et glucides, hormones?).

Une importante exorption sur eau par rapport aux sels est relativement observée régulièrement chez toutes les variétés, à chaque fois que la plantule est défoliée totalement ou partiellement. L'effet de la feuille 4 et l'apex paraît atténué par les sels à l'obscurité, par contre, il est stimulé par les sels à la lumière et la différence d'exorption entre l'eau et les sels est diminuée de ce fait. Il est stimulé aussi par les feuilles 1 et 2. Ces observations montrent que le signal chimique par lequel les feuilles matures et la zone en croissance (feuille 4 et l'apex) exercent séparément leurs contrôles sur l'efflux sont des molécules dont la synthèse et le transport de la source vers la cible sont dépendants de la lumière, des ions ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $PO_4^-$ ,  $SO_4^-$ , ...) et des feuilles matures. Ces résultats concordent avec ceux extraits de la littérature (Glass, 1989; Imsande et Touraine, 1994; Abdellaoui et al., 2001) et supportent la conclusion que le contrôle de l'exsorption implique les différentes parties foliaires (âgée et jeune) et le système racinaire et que le degré de contribution de chacun de ces deux organes est génotype-dépendant. Cependant, on ne sait pas si les racines et les feuilles contribuent séparément ou en interaction dans ce contrôle et si l'effet de l'un est affecté ou modulé par l'autre.

Des expériences de défoliation partielle plus détaillées montrent que chez la variété Tegye32 privée de la première feuille mature ou des deux premières feuilles matures ([F1] et [F1,2]), l'exsorption augmente à la lumière et à l'obscurité (eau et sels), comparés aux plantes intactes à la lumière (contrôle), excepté (-F1) sur eau à l'obscurité. Chez Achtar, l'ablation de ces feuilles augmente l'exsorption seulement sur sel à l'obscurité comparée au contrôle. Chez (-F1) Saba, l'exsorption varie légèrement à l'obscurité (eau et sels), tandis



qu'elle augmente significativement à la lumière (eau et sels) comparée au contrôle. Chez (-F<sub>1,2</sub>) Saba, l'exsorption diminue beaucoup à l'obscurité (eau et sels), tandis qu'à la lumière elle augmente beaucoup sur eau seulement, comparée au contrôle. Chez (-F<sub>1</sub>) Saâda, sur sels l'exsorption diminue significativement à l'obscurité et augmente beaucoup à la lumière, tandis que sur eau elle reste semblable à celle du contrôle à la lumière et l'obscurité. Chez (-F<sub>1,2</sub>) Saâda, sur sels l'exsorption diminue aussi à l'obscurité et augmente spectaculairement à la lumière, tandis que sur eau elle augmente seulement à la lumière, comparée au contrôle. L'ablation des feuilles matures ([-F<sub>1,2</sub>]) chez Saâda et Saba diminue considérablement aussi l'exsorption sur sels-obscurité comparée aux plantes intactes à l'obscurité. L'ablation des feuilles matures, en générale, stimule l'exsorption à la lumière et la diminue à l'obscurité. L'activité des jeunes parties sur l'exsorption est stimulée beaucoup par la lumière. Les sels modulent cette activité en la diminuant à l'obscurité ou l'augmentant à la lumière (en fonction des variétés). De plus ces résultats montrent pour la première fois que la feuille 3 stimule aussi l'exsorption comme la feuille 4 et l'apex et que l'activité de ces jeunes parties est stimulée par les feuilles matures à l'obscurité car quand ces feuilles matures sont éliminées ([-F<sub>1,2</sub>]), l'exsorption à l'obscurité diminue considérablement comparée à celle des plantes intactes maintenues à l'obscurité. L'effet des feuilles matures est génotype-dépendant (élevé chez Saâda et Saba, faible chez Achta et nul chez Tegye<sup>32</sup>), suggérant que la racine aussi bien que la partie aérienne est probablement impliquée dans la régulation interne de l'exsorption. L'ensemble de ces résultats est en faveur de l'implication de plusieurs signaux chimiques (acides aminés, glucides, hormones?) dans le contrôle de l'exsorption. Le fait que la défoliation peut provoquer une remobilisation des protéines de réserves et une augmentation du pool d'acides aminés circulant dans la plante est en faveur de l'implication des acides aminés dans l'augmentation de l'exsorption par l'ablation des feuilles. D'autre part, le fait que les réserves existantes dans les feuilles matures soutiennent l'exsorption à l'obscurité et que l'ablation des feuilles matures, en générale, stimule l'exsorption à la lumière et la diminue considérablement à l'obscurité, suggère l'implication de molécules stimulantes de l'exsorption (acides aminés, hormones?) associées à l'existence d'au moins deux sites (apex et feuilles matures) et deux voies de synthèses du signal chimique (utilisant des précurseurs nouvellement synthétisés à la lumière ou des précurseurs pré-existants à l'obscurité) et/ou un seul site et une seule voie impliquant une communication et un transport de substances entre l'apex et les feuilles matures (Fig. 1).



Dans notre travail, bien que la méthode utilisée dans l'estimation de l'exsorption (quantité de nitrate retrouvée dans la solution d'incubation) concerne l'efflux et la re-absorption du nitrate efflué et non pas seulement l'efflux, son apport a été considérable dans la mise en évidence d'une variabilité génétique et d'une régulation des processus de l'efflux par des facteurs exogènes (lumière, nitrate et sels) et endogènes (réduction du nitrate, translocation de glucide et leur catabolisme dans la racine, racines et feuilles). Cette approche méthodologique à l'avantage d'être simple d'emploi, moins coûteuse et constitue de ce fait une performance inaccessible aux autres méthodologies de marquages isotopiques qui sont très coûteuses, lourdes, fatigantes et surtout très dangereuses pour l'environnement ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{14}\text{C}$ ). Elle permet d'estimer les pertes réelles du  $\text{NO}_3^-$  (nitrate efflué moins nitrate ré-absorbé par la plante) ou d'un autre composé sur un grand nombre d'échantillons.

Par ailleurs, le fait que les pertes de nitrate soient déterminées en absence de nitrate exogène pendant 8 heures seulement ainsi que le fait d'avoir renouveler la solution d'efflux toutes les 30 ou 120 minutes nous permettent de considérer que les variations de pertes de nitrates sont dues en grande partie à des variations de l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  parce qu'en présence de nitrate à l'état de trace l'activité du système de l'influx (HATS susceptible de ré-absorber le nitrate efflué) est relativement constante à court terme et la stimulation de l'influx par l'absence de nitrate n'est maximale qu'après seulement plusieurs dizaines d'heures après le retrait du nitrate du milieu extérieur (7 jours chez le blé âgé de 21 jours, Talouizte et al., 1986; Touraine et Gojon, 1997).

D'autre part, le fait d'utiliser des plantes issues de la même culture dans la comparaison de l'effet des différents traitements et le fait que les variétés effluent des quantités importantes de nitrate ont rendu cette méthode un outil idéal pour approcher la régulation du processus de l'efflux comme nous l'avons démontré dans la mise en évidence de l'effet des sels, l'étude de l'interaction efflux de nitrate-efflux de sucres et l'étude de l'effet des différentes feuilles sur l'efflux. L'utilisation de la technique split-root permettrait de vérifier s'il y a une variation spatiale dans l'activité et/ou l'abondance du système de l'efflux dans les racines, comme a été trouvé pour l'influx (Colmer et Bloom, 1998), ainsi qu'une variation spatiale de la régulation de l'efflux dans les racines, comme a été trouvé dans la partie aérienne (**chapitres 7 et 8**; Abdellaoui et al., 2001).

Nos efforts futurs porteront sur le perfectionnement de cette méthode pour aborder l'influence de l'architecture racinaire sur l'efflux et l'influx des nitrates et d'autres substances telles que les sels, les sucres, les acides aminés et les acides organiques.

Les perspectives de recherche sur le fonctionnement du système de l'efflux sont multiples. Les alternatives qui retiennent mon attention sont basées sur les données présentées dans ce mémoire.

Etant donné le nombre élevé de variétés marocaines de blé tendre (améliorées et indigènes), les études menées jusqu'à présent n'ont pu porter que sur huit variétés (**Partie II**; Abdellaoui, 2001). Il importe de les généraliser afin de déterminer les lois qui régissent l'acquisition et le métabolisme du nitrate des variétés marocaines de blé tendre.

La caractérisation et l'étude des propriétés cinétiques et de régulation des systèmes enzymatiques mis en jeu dans la biosynthèse des glucides, des acides organiques et des acides aminés facilitera la compréhension des mécanismes de régulation de l'efflux et de coordination de l'absorption aux besoins de la plante. Un apport supplémentaire d'informations concernant la variation spatiale de l'activité nitrate réductase, de l'absorption et de la distribution de l'azote en relation avec le carbone et la croissance et en particulier comment ces caractères varient entre les cultivars supportera certainement les explications spéculées sur la variabilité de l'efflux et de son contrôle. Les mécanismes et les signaux chimiques (glucides, acides organiques, acides aminés et hormones?) responsables de l'activation/inactivation et/ou de la répression/dérépression des protéines du système de l'efflux mis en jeu par les racines et la partie aérienne devront être recherchés. Ces études couplées aux images de la distribution tissulaire du  $^{14}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}$  et de la spectroscopie localisée de résonance magnétique nucléaire (microscopie RMN) du  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{14}\text{C}$  devraient nous fournir des indications sur la distribution du système de l'efflux dans les racines et le plasmalemmes ainsi que sur les voies métaboliques impliquées dans le contrôle de l'acquisition des nitrates par l'efflux à l'échelle de la plante entière.

La démarche adoptée paraît pouvoir fournir outre des informations sur le métabolisme, peu étudié, des variétés marocaines de blé tendre en particulier dans les racines et l'impact des feuilles sur celui-ci, les connaissances nécessaires pour comprendre le mécanisme et la régulation de l'efflux par certains facteurs exogènes et endogènes et leurs interactions. Ces études sont un préalable indispensable à l'étude de la nature et des gènes du système de l'efflux ainsi qu'à l'étude des gènes gouvernant les relations racines-feuilles dans le contrôle de l'absorption des nitrates.

## **CHAPITRE 5**

**Effects of an ionic and hypo-osmotic treatments on NO<sub>3</sub><sup>-</sup> losses:  
Influence of light and genotype**

Mohammed BenDriss Amraoui, Asmae Malali, and Ahmed Talouizte

Laboratory of plant physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar el Mehraz,  
P.O. Box 1796, Atlas, Fès, Morocco

Les résultats de ce chapitre sont présentés tels qu'ils ont été soumis pour publication dans  
*Acta Agronomica Hungarica*

Corresponding author: BenDriss Amraoui Mohammed, Laboratoire de Physiologie végétale,  
Département de Biologie, Faculté des Sciences Dhar el Mehraz B.P. 1796, Atlas, Fès, Maroc.

Telephone & Fax: (212) 055-73-29-81

E-mail: msms\_60@hotmail.com

## Résumé

Nous avons observé précédemment que les sels affectent l'efflux du nitrate chez le blé. Pour voir si cet effet est dû à KCl, l'efflux du  $\text{NO}_3^-$  en présence ou en absence de KCl ainsi que dans l'eau (traitement hypo-osmotique) sont comparés chez quatre variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L. var. Achtar, Saâda, Saba and Tegye32). Comparé au  $\text{CaCl}_2$ , KCl augmente significativement l'efflux chez Saâda et Saba à la lumière et l'obscurité, mais réduit significativement l'efflux chez Achtar à la lumière et légèrement à l'obscurité, tandis que pour Tegye32 il réduit et augmente significativement l'efflux à la lumière et l'obscurité, respectivement, durant 8 h. Ces résultats indiquent l'implication de l'influx de  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  eux-mêmes et la lumière dans le mécanisme d'action du KCl, suggérant que les différences notées entre les deux solutions ( $\text{CaCl}_2$  et KCl) quant à l'efflux sont dues à un effet ionique généré par  $\text{K}^+$ . Ces résultats suggèrent aussi que les différences variétales dans la réponse de l'efflux au KCl peuvent être dues à des différences en anions organiques endogènes qui peuvent réduire l'influx du  $\text{Cl}^-$  et compenser le manque d'équivalents en charge négative dans le cytosol et l'exsudat xylémique quand le  $\text{NO}_3^-$  est éliminé de la solution. Comparé à  $\text{CaCl}_2$ , l'eau à la lumière augmente l'efflux chez Saâda et Saba (8 h) et diminue chez Achtar (avant 6 h) mais ne l'affecte pas significativement chez Tegye32, tandis qu'à l'obscurité, il l'augmente significativement chez Achtar (après 4 h), Tegye32 (après 1 h) et Saâda (avant 2 h) mais le réduit légèrement chez Saba (avant 2 h). Ce résultat montre que la perte en  $\text{NO}_3^-$  peut être augmentée par élévation de la turgescence des cellules racinaires causée par le traitement hypo-osmotique, suggérant que le canal de l'efflux du  $\text{NO}_3^-$  est aussi sensible à la turgescence. Cependant, quand l'efflux sur eau-lumière est comparé à celui sur eau-obscurité aucune différence n'est trouvée chez toutes les variétés, excepté Tegye32, par contre si la même comparaison est faite pour l'efflux sur  $\text{CaCl}_2$ , des différences importantes sont trouvées chez toutes les variétés, excepté Tegye32. Ceci montre une activation du système de l'efflux du nitrate et probablement une inhibition de la réduction du nitrate par le traitement hypo-osmotique via une augmentation de la turgescence, comme a été démontré pour l'efflux du  $\text{K}^+$  et du saccharose (Walker et al., 2000). Ceci suggère que l'efflux du nitrate et probablement la réduction du nitrate sont impliqués dans la régulation de la turgescence. Dans cette étude, un mécanisme d'action du KCl sur l'efflux est proposé et les différences variétales dans la réponse de l'efflux au KCl sont discutées.

**Mots clés:** KCl;  $\text{CaCl}_2$ ; efflux du  $\text{NO}_3^-$ ; blé; turgescence; génotype

### Abstract

In an earlier paper we have observed that salts affect  $\text{NO}_3^-$  efflux from wheat roots. To see if this effect is due to KCl,  $\text{NO}_3^-$  efflux in solution with or without KCl and in water (hypo-osmotic treatment) were compared for four wheat varieties (*Triticum aestivum* L. var. Achtar, Saâda, Saba and Tegye32). As compared to  $\text{CaCl}_2$ , KCl increases significantly  $\text{NO}_3^-$  efflux from Saâda and Saba in light and dark, but reduces significantly loss from Achtar in light and slightly in dark, whereas for Tegye32 it reduces and increases significantly loss in light and dark, respectively, during 8 h. These data indicate the involvement of  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  influx themselves and light in the action mechanism of KCl, suggesting that differences noted between both salt solutions ( $\text{CaCl}_2$  and KCl) in  $\text{NO}_3^-$  efflux are due to an ionic effect generated by  $\text{K}^+$ . It is also suggested that the varietal differences in the response of efflux to KCl may be due to differences in endogenous organic anions which may both reduce  $\text{Cl}^-$  influx and compensate the lack of negative charge equivalents in the cytosol and in the xylem exudates when  $\text{NO}_3^-$  is removed from the solution. As compared to  $\text{CaCl}_2$  in light, hypo-osmotic treatment increases  $\text{NO}_3^-$  loss for Saâda and Saba and decreases for Achtar (before 6 h) but does not affect significantly loss for Tegye32, whereas in dark, it increases significantly loss for Achtar (after 4 h), Tegye32 (after 1 h) and Saâda (before 2 h) but decreases slightly for Saba (before 2 h). This data shows that  $\text{NO}_3^-$  loss may be increased by elevated root cell turgor caused by the hypo-osmotic treatment, suggesting that  $\text{NO}_3^-$  efflux channel is also turgor-sensitive. Interestingly, when loss in water-light is compared to that in water-dark no differences are found in all varieties, except for Tegye32, whereas if the same comparison is made for  $\text{NO}_3^-$  efflux in  $\text{CaCl}_2$ , important differences are found in all varieties, except for Tegye32. This shows an activation of  $\text{NO}_3^-$  efflux system and probably an inhibition of nitrate reduction in light by the hypo-osmotic treatment via an increase of turgor, as demonstrated for the efflux of  $\text{K}^+$  and sucrose (Walker et al., 2000). This suggests that the efflux system and probably nitrate reduction are involved in the regulation of turgor. In this study, an action mechanism of KCl on  $\text{NO}_3^-$  efflux is proposed and varietal differences in the response of efflux to KCl are discussed.

**Key words:** KCl;  $\text{CaCl}_2$ ;  $\text{NO}_3^-$  efflux; wheat; turgor; genotype



## Introduction

It is well established that salt accumulation caused by unsuitable irrigation practices decreases crop productivity (Epstein et al., 1980). Several physiological reactions are affected in plants by salts, including the inhibition of nitrogen uptake which is the most important mineral for plants (Smith, 1973; Peuke et al., 1996; Peucke and Jeschke, 1999).

Most research on the inhibiting effect of salt on nitrate uptake have been performed under salinized rhizosphere conditions (Aslam et al., 1984; Ward et al., 1986; Ourry et al., 1992; Hawkins and Lewis, 1993; Botella et al., 1994) and evidence was found that the two nitrate systems were influenced by salt in different ways (Peucke and Jeschke, 1999). In these papers, nitrate uptake was treated as a single or as two simple mechanisms (high- and low-affinity transport system: HATS and LATS), but neither the exact nature of LATS nor the explanation of its strange response to salinity are known (Peucke and Jeschke, 1999). Little is also known about the action mechanism of salts on these uptake systems even at physiological concentration.

However, the uptake of nitrate into the roots of plants is the result of the net influx and efflux which are regulated independently (Aslam et al., 1995; Clarkson, 1986) and whose roles in the regulation of uptake are still a matter of debate. For a complete description of the inhibition of nitrate uptake by salt it is, thus, necessary to distinguish between the two uptake components: influx and efflux. Moreover, one cannot well know whether salt effects on uptake are primarily upon influx or efflux. Since they are independent uptake components it is possible that even at physiological concentration salt may act in different ways and degree on both.

However, it was shown in an earlier paper that salts at physiological concentration affect also  $\text{NO}_3^-$  loss from wheat roots (BenDriss Amraoui et al., 2000), but this event was found to vary with genotypes (i.e. increase or decrease loss), suggesting that salt effects on nitrate uptake may be also mediated via at least one or two nitrate efflux systems (slow- and rapid-type channels, Frachisse et al., 2000) and probably in different ways as found for influx systems (Peuke and Jeschke, 1999). Moreover, the salt to which  $\text{NO}_3^-$  loss is more sensitive and the nature of salt effects (osmotic or ionic) on loss are not well known. The aim of the present paper was to examine the effect of KCl and  $\text{CaCl}_2$  salts at physiological concentration and of hypo-osmotic treatment (water) on  $\text{NO}_3^-$  efflux from wheat roots. To address this, we grown four wheat genotypes: Achar, Saâda, Saba and Tegye32 on  $\text{NO}_3^-$  and we estimate nitrate release from roots in bathing solution containing KCl,  $\text{CaCl}_2$  or distilled water alone.

## Materials and methods

### Plant material and growing conditions

Wheat seeds (*Triticum aestivum* L., var. Achtar, Saâda, Saba and Tegye32) disinfected for 5 min in sodium hypochlorite (37 g/l) were soaked for 8 h in distilled water and then allowed to germinate for 6 days on moist cheesecloth in darkness at 18 to 20°C. Seedlings were planted in groups of 25 in plastic holders and placed in 5 litres  $\text{NO}_3^-$  solution. The  $\text{NO}_3^-$  solution at pH 5.5 contained 3 mM  $\text{KNO}_3$ , 2.5 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.75 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 mM  $\text{NaCl}$ , 0.75 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 6  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 48.5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 16.5  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  and 0.5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . Iron was added as 10 mg of  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA per litre of  $\text{NO}_3^-$  solution. Solutions were constantly aerated and changed every three days. Growth was carried out in controlled chamber where light was applied during a 16 h photoperiod by white fluorescent bulbs (mixolamp 160W) and tubes (40W) to give 2000 lux at pot level. Temperature was maintained at 21°C in light period and 18°C in dark period. Relative humidity was about 65%.

### Plant treatments

On the 21<sup>st</sup> day after soaking, three hours after the start of the light period four intact plant roots of each variety were rinsed three times with distilled water and placed in light or dark in a test tube containing 40 ml of distilled water or salt solutions, at pH 5.5, similar to the complete nutrient solution except that nitrate salts was replaced by 3 mM  $\text{KCl}$  and 2.5 mM  $\text{CaSO}_4$  or by 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$  and 2.5 mM  $\text{CaSO}_4$ . In the later solution, 0.75 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 0.25 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  were also replaced by 0.75 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and 0.25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  to eliminate all potassium trace from bathing solution. The solutions were constantly aerated. At the end of the first hour, the roots were placed in another 40 ml of the identical solution for 1 h. The sequence was continued through 2-8 h and the medium was changed every two hours. At the end of the experimental period (8 h), the seedlings were removed; roots and shoots were excised, dried and weighed.  $\text{NO}_3^-$ -N leaked out from roots to solution at different times were concentrated separately in 2 ml of distilled water and determined according to the method of Cataldo et al. (1975). For each variety four repetitions (each of 4 plants) were realized for each treatment. For each repetition five determinations were made during the time with the same plants. In the Figures,  $\text{NO}_3^-$  efflux is given in  $\mu\text{g}$   $\text{NO}_3^-$ -N/g root dry weight. The data were analysed by ANOVA (analysis of variance) to prove the significant difference between varieties and between treatments. Standard errors were calculated for all means and where no error bars appear, the standard error falls within the size of the symbol.

## Results and discussion

Nitrate is widespread water pollutant in many agricultural regions (McLay et al., 1991). Many studies have been reported on  $\text{NO}_3^-$  loss and on the effect of salts on crop physiology and productivity, including nitrate uptake (Minotti et al., 1968; Rufty et al., 1981; Ward et al., 1986; Navari-Izzo et al., 1988; Olmos et al., 1994; Gossett et al., 1994; Yeo and Flowers, 1994; Aslam et al., 1984, 1995; Aouad et al., 1998; Kinraide, 1999), but little information is available on the effect of salt on nitrate efflux from plants, and neither the genetic variability in this effect nor the mechanism and the physiological significance of this event is currently well understood.

The varieties, contrasting in nitrate-N release in salt (BenDriss Amraoui et al., 2000, **chapter 4**), responded differently to the nature of salts with marked differences in  $\text{NO}_3^-$  leakage across the membrane of the root cells (Fig. 1). As compared to  $\text{CaCl}_2$ , KCl stimulates significantly  $\text{NO}_3^-$  loss for Saâda and Saba (in light and dark) and reduces significantly for Achtar in light and slightly in dark, whereas for Tegye32 it reduces and stimulates significantly in light and dark, respectively (Fig. 1). The fact that these differences between KCl and  $\text{CaCl}_2$  appeared rapidly after the first hour following transfer (at 0 h) of plants to bath solution shows a direct effect of salts on  $\text{NO}_3^-$  fluxes at the plasma membrane level. This also shows that the effects of salts on  $\text{NO}_3^-$  efflux, which is genotype dependent, is due to KCl.

$\text{NO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$  influxes, which may be linked to  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$  effluxes, have been reported to decline into root high in  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$  and when the medium is lacking in  $\text{K}^+$  or  $\text{Na}^+$  (Smith, 1973), but to our knowledge little if any studies have been performed on cation effects on efflux of  $\text{NO}_3^-$  in spite of the fact that strong inhibition of nitrate uptake by chloride and sulphate salts has been found (Aslam et al., 1984). Moreover, one cannot know neither how these effluxes are balanced chemically at the plasma membrane nor if they are balanced similarly at the tonoplast. The present data cannot elucidate this, but show that  $\text{K}^+$  withdrawal reduces also  $\text{NO}_3^-$  efflux as found for  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$  influxes (Smith, 1973).

However, it has been shown that KCl was able to disrupt the inactive phosphorylated nitrate reductase (NR):14-3-3 complex (Athwal et al., 1998). This may reverse the stimulatory effect of dark-induced NR inactivation (Deng et al., 1990; Scaife and Schloemer, 1994; Delhon et al., 1995; MacKintosh et al., 1995) on  $\text{NO}_3^-$  efflux and allow the root cells to maintain a relatively high NR and low cytosolic concentration of nitrate ( $[\text{NO}_3^-]_{\text{cyt}}$ ) in darkness. But, the fact that  $\text{NO}_3^-$  loss remains generally higher in dark than in light even in

KCl (in Saâda [8 h], Saba [before 4 h] and Tegye32 [8 h]) and that KCl, compared to CaCl<sub>2</sub>, also stimulates loss in dark (in Saâda, Saba and Tegye32, Fig. 1) suggest that external KCl cannot disrupt dark NR inactivation.

This low effect of KCl solution on activation of NR may be due to the presence of high amount of inactivated NR and/or to low KCl uptake in dark (for Saâda, Saba and Tegye32, in contrast to Achtar, Fig. 1) since uptake of K<sup>+</sup>, in contrast to Cl<sup>-</sup>, is responsive to supplies of carbon assimilates from the shoots (Jarvis et al., 1990; Moya et al., 1999). But, the fact that KCl compared to CaCl<sub>2</sub> also stimulates loss in dark shows that the second suggestion may not be true. In spite of this, the fact that loss vary with the nature of salts and the activity of NR (in light and dark) suggests the implications of ion fluxes and nitrate reduction in the action of KCl and CaCl<sub>2</sub> on NO<sub>3</sub><sup>-</sup> efflux.

KCl, compared to CaCl<sub>2</sub>, increases more NO<sub>3</sub><sup>-</sup> loss in light than in dark only for Saâda and Saba (Fig. 1). This observation suggests the involvement of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> influxes in the action mechanism of KCl which is highly activated by light. The low differences which exist between KCl and CaCl<sub>2</sub> in dark raise some questions. Are they due to an activation of nitrate loss in both solutions by deactivation of reduction in dark and/or to low effect of KCl and CaCl<sub>2</sub> on membrane fluxes in dark? In KCl, dark increases NO<sub>3</sub><sup>-</sup> efflux, compared to light, for Saâda, Saba (before 4 h) and Tegye32, whereas in CaCl<sub>2</sub>, dark increases efflux only for Saâda and Saba but has no effect for Tegye32. For Achtar, dark has no increasing effect in KCl and has an inhibiting effect in CaCl<sub>2</sub>.

This absence of dark effects for Achtar and slightly for Tegye32 is not understood and could be due to specific membrane traits of these genotypes. However, dark, compared to light, increases more NO<sub>3</sub><sup>-</sup> loss in CaCl<sub>2</sub> than in KCl for Saâda and Saba. This is due to high decrease of loss in light, compared to dark, by CaCl<sub>2</sub> than by KCl. This confirms the action of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> influxes on NO<sub>3</sub><sup>-</sup> efflux system and their activation by light, since efflux in KCl-light may override that in KCl-dark as found here in Saba after 4 h (Fig. 1).

These observations also show that light activates even the inhibitory effect of CaCl<sub>2</sub> on loss as pointed out above for the stimulatory effect of KCl. Indeed, Tsugane et al. (1999) have observed that light, even at moderate intensities, mediated by photosynthetic activity, increased the salt sensitivity induced by an enhancement of cation and anion channels and probably also proton pump activities as occurred here for Saâda and Saba in KCl and CaCl<sub>2</sub> solutions. However, the fact that KCl and CaCl<sub>2</sub> effects differ highly here, shows that the ion itself (K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>) at 3 mM is more important as a stimulator of efflux for Saâda and Saba

than is the osmotic effect, since there is slight difference between KCl and CaCl<sub>2</sub> solutions in osmotic pressure (estimated by Vant'Hoff law [ $PV = nRT$ ], data not shown).

It is suggests that NO<sub>3</sub><sup>-</sup> efflux here varied under an ionic effect generated by 3 mM KCl, in contrast to the HATS of nitrate which is found to be inhibited by an osmotic effect caused by NaCl in 1 to 100 mM concentration range; whereas an ionic one (stimulator) is found for the LATS from 1 to 60 mM in the low nitrate concentration range (0 to 1.5 mM, [Peuke and Jeschke, 1999]). The hypothesis of Peuke and Jeschke (1999) according to which the inhibition of nitrate uptake by salts is largely due to an osmotic effect and at lesser extent to an ionic one is not supported by the present data. However, our data may not predict if the osmotic effect may be more important than an ionic one because both salt solutions do not differ highly in osmotic pressure and any effect of osmotic variations is studied here. But, they show that nitrate uptake may be influenced by an ionic effect on NO<sub>3</sub><sup>-</sup> loss.

The fact that for Achtar KCl does not increase NO<sub>3</sub><sup>-</sup> loss (in light and dark) more than CaCl<sub>2</sub> suggests that KCl has low effect on the root cell membrane activity of this variety which has low leakage activity in KCl solution. Similarly, a high ionic peroxidase (IP) was suggested to be associated to processes of rigidification and lignification of root cell walls (Olmos et al., 1994; Gossett et al., 1994). Recently, it has been found that the roots of 21-day-old seedlings of Achtar have higher IP activity than Saâda under non saline conditions (Aouad et al., 1998). It is suggests the existence of a high cell wall rigidification in Achtar, which may be responsible for the low efflux from Achtar. In addition, Sacchi et al. (2000) have showed that influx of glucose is reduced by salinity, whereas the efflux is only slightly affected, leading them to the conclusion that the effect of salt is mainly due to an effect on the system involved in the re-absorption of the hexose rather than on its efflux. This observation suggests that since KCl does not increase nitrate efflux in Achtar, it may be due to low decreasing effect of KCl on the HATS implied in the re-absorption of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in KCl solution.

Furthermore, the fact that in light Tegye32 lost low NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in KCl than in CaCl<sub>2</sub> as for Achtar and that in dark it lost significantly more NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in KCl than in CaCl<sub>2</sub> as for Saâda and Saba, indicates that in Tegye32 the HATS is probably slightly reduced by KCl (at 3 mM) in contrast to those of Saâda and Saba which are probably highly reduced (Fig. 1). This assumption may not be excluded here since Peuke and Jeschke (1999) have found that, even at 1 mM of NaCl, the HATS is reduced by an osmotic effect rather than by an ionic one. This observation suggests that here KCl may not only affect nitrate efflux by an ionic effect but may affect it also via its osmotic effect on the HATS. However, more detailed analysis about this are needed to elucidate this possibility.

Interestingly, Smith (1973) reported some decrease of net  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$  influxes into roots high in organic anions, and under these conditions net  $\text{NO}_3^-$  influx is completely independent of cation influx. On the other hand, Triplett et al. (1980) demonstrated that organic anions (OA) were accompanying cations in the xylem exudates of  $\text{K}_2\text{SO}_4$ -treated wheat plants. Recently, Siebrecht and Tischner (1999) found that the resulting lack of negative charge equivalents after the removal of  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{KNO}_3$  and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  replaced by  $\text{KCl}$  and  $\text{CaCl}_2$ ) was not compensated either by a reduction in the cation concentration nor by an increase in inorganic anions ( $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) and the slight increase of  $\text{Cl}^-$  in plant and xylem exudates was not sufficient to compensate for the lack in negative charge equivalents. They conclude that it is balanced by an increased xylem loading of OA.

Since  $\text{KCl}$  does not increase  $\text{NO}_3^-$  loss for Achtar (in light and dark) and Tegye32 (in light), in contrast to Saâda and Saba, their roots which are likely rich in OA (due to high nitrate reduction, **chapter 3**) reduce  $\text{Cl}^-$  influx, by making it independent of  $\text{K}^+$  influx, and compensate the lack of negative charge equivalents in the cytosol and xylem exudates by OA. This leads to  $\text{K}^+$  influx alone and subsequently to low  $\text{K}^+$  and  $\text{NO}_3^-$  effluxes from these varieties. Similar scenario occurred in the cytosol of guard cells during the stomatal opening (Humble and Raschke, 1971) and data which have showed that organic acids (malate and succinate, Abdellaoui, 2001) reduce considerably nitrate efflux in wheat seedlings support this suggestion. Nevertheless, data of Sacchi et al. (2000) for glucose uptake in saline condition suggest that this diminution of efflux by organic acids may be also due to a direct stimulation of the influx system by malate decarboxylation and subsequently by re-absorption of effluxed  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_3^-/\text{HCO}_3^-$  antiport, Touraine et al., 1988; Touraine et Gojon, 1997).

$\text{Ca}^{2+}$  is found to be necessary for the maintenance of membrane selectivity of ion uptake and retention by plant cells (Marschner, 1986). Under non-saline and saline acidic environments,  $\text{Ca}^{2+}$  increased the net  $\text{NO}_3^-$  uptake (Ward et al., 1986).  $\text{Ca}^{2+}$  induced increase in  $\text{Cl}^-$  efflux via channel was also found by Johannes et al. (1998). An effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on  $\text{NO}_3^-$  efflux was reported by Aslam et al. (1995), who suggest that  $\text{Ca}^{2+}$ , which may bind with anion groups of membranes to form bridges between structural components (Garrard and Humphrey, 1967), may regulate directly the opening and closing of  $\text{NO}_3^-$  channels. However, the fact that here loss from Saâda and Saba (in light and dark) and Tegye32 (in dark) declined in  $\text{CaCl}_2$ , compared to  $\text{KCl}$ , even if  $\text{KCl}$  solution also contained 2.5 mM  $\text{CaSO}_4$  (see material and methods section) indicates that differences between  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{KCl}$  in loss are due to the nature of the counter-ion associated to  $\text{Cl}^-$  ( $\text{K}^+$  or  $\text{Ca}^{2+}$ ). This means that the

reduction of  $\text{NO}_3^-$  loss and  $\text{Cl}^-$  influx, reported here in  $\text{CaCl}_2$  solution, is due entirely to  $\text{CaCl}_2$  itself and not to 2.5 mM  $\text{CaSO}_4$  (Fig. 1). The low mobility of  $\text{Cl}^-$  in  $\text{CaCl}_2$  solution, as found by Minotti et al. (1968) for  $\text{NO}_3^-$  in  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , is thus the major cause of decreased loss in  $\text{CaCl}_2$  because when  $\text{Cl}^-$  is associated with  $\text{K}^+$  its effect is higher than with  $\text{Ca}^{2+}$ . This shows that  $\text{CaCl}_2$  relieved  $\text{Cl}^-$  effect on  $\text{NO}_3^-$  leakage by restricting  $\text{Cl}^-$  mobility and uptake (Fig. 1).

Uptake of  $\text{K}^+$  occurs by low-affinity system via  $\text{K}^+$  channel (Kochian and Lucas, 1982) and the charge compensation for  $\text{K}^+$  uptake is achieved by  $\text{H}^+$  extrusion (Behl and Raschke, 1987; Kochian and Lucas, 1988; Maathuis et al., 1997). Influx of  $\text{Cl}^-$  via an electrogenic  $\text{Cl}^-/2\text{H}^+$  symporter has been suggested (Beilby and Walker, 1981; Poole, 1988; Felle, 1994; Wang and Iino, 1998).  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  influxes are found to be mutually dependent, suggesting that the return of extruded  $\text{H}^+$  to the cytosol may facilitate  $\text{Cl}^-$  influx. In support of this suggestion, Wang and Iino (1998) found that the shrinking protoplasts could not recover their volume when incubated in a medium adjusted to neutral pH.

However, the fact that effluxes of anions ( $\text{Cl}^-$ ,...) and cations ( $\text{K}^+$ ,...) produce water efflux while  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  influxes water influx (Wang and Iino, 1998) and that elevated turgor increases effluxes of solutes (sucrose, potassium and anions, Walker et al., 2000) suggest that when  $\text{Cl}^-$  influx is not reduced, but is occurred concomitantly to that of  $\text{K}^+$  (in Saâda and Saba), water influxes and root cell volume may increase leading to the necessity of osmoregulation thereby facilitating likely effluxes of  $\text{K}^+$  and anions ( $\text{Cl}^-$  or  $\text{NO}_3^-$ ) as found by Walker et al. (2000). In favour of this conclusion, Moya et al. (1999) have found that root uptake and leaf accumulation of chloride might be linked to water absorption and transpiration, respectively. This suggests that here  $\text{NO}_3^-$  loss may be a consequence of KCl uptake and play a role in cell volume regulation as found for the central role of anion channels in  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  regulation, in addition to their established roles in turgor/volume regulation and signal transduction (reviewed in Johannes et al., 1998).

However, the fact that  $\text{NO}_3^-$  uptake and influx were found to be inhibited by an osmotic effect (Peucke and Jeschke, 1999) suggests that  $\text{NO}_3^-$  efflux may be affected too by an osmotic one. To test this,  $\text{NO}_3^-$  loss in distilled water (hypo-osmotic solution) is compared to that in  $\text{CaCl}_2$  solution (Fig. 1). The hypothesis according to which  $\text{NO}_3^-$  loss is induced by osmoregulation and elevated turgor is also tested by this experiment. In light, water, compared to  $\text{CaCl}_2$ , increases significantly  $\text{NO}_3^-$  loss for Saâda and Saba and decreases significantly for Achtar (before 6 h) but does not affect significantly loss for Tegye32. Whereas in dark, it increases significantly loss for Achtar (after 4 h), Tegye32 (after 1 h) and Saâda (before 2 h) but decreases slightly for Saba (before 2 h, Fig. 2). The increase of

loss in dark for Tegye32 and Achtar is less intensive than the increase in light for Saâda and Saba.

This data shows an increase of  $\text{NO}_3^-$  loss by an elevated root cell turgor caused by the hypo-osmotic treatment (Fig. 2). This result is in agreement with data of Zhang et al. (1996) and Walker et al. (2000) which showed an increase of sucrose and potassium caused by an hypo-osmotic shock and increase of turgor with water. However, these data demonstrated that turgor increases efflux of some solutes from coats of developing seed and suggest an increase of anion efflux by turgor, but they do not report information about the nature or the amount of these effluxed anions. On the other hand, our results show that elevated plant turgor increases loss of anions, in particular  $\text{NO}_3^-$  loss from root. Indeed, the fact that water compared to both solutions (KCl and  $\text{CaCl}_2$ ) increases efflux (for example: Saâda and Saba in  $\text{CaCl}_2$  and Achtar in KCl, Figs. 1 and 2) confirms that  $\text{NO}_3^-$  efflux channel is turgor-sensitive.

Interestingly, when loss in water-light is compared to that in water-dark we found no differences between the two treatments for all varieties, except for Tegye32, whereas if the same comparison is made for  $\text{CaCl}_2$  we found high differences for all varieties, except for Tegye32 (Fig. 2). Data of loss in water show an activation of  $\text{NO}_3^-$  efflux system and probably an inhibition of nitrate reduction by the hypo-osmotic solution in light for Achtar, Saâda and Saba as occurred by darkness. However, in contrast to these varieties,  $\text{NO}_3^-$  loss is not increased and nitrate reduction is not probably inhibited in light by water for Tegye32 since loss remains low in water-light relative to water-dark (Fig. 2). The fact that transpiration and leaf accumulation of nitrate in Tegye32 are higher than in the other varieties in light (**chapters 1 and 3**) is in favour of the observed low  $\text{NO}_3^-$  loss in water-light in Tegye32 and allows us to think that water does not probably increase turgor in this variety. However, the fact that loss in  $\text{CaCl}_2$ -light remains very low relative to that in  $\text{CaCl}_2$ -dark for all varieties, except for Tegye32, confirms the observed effect of elevated turgor on  $\text{NO}_3^-$  loss and suggests the implication of NR activity together with  $[\text{NO}_3^-]_{\text{cyt}}$  and nitrate efflux system in turgor/volume regulation.

In conclusion, the present data indicate that salt has a direct effect on  $\text{NO}_3^-$  loss at the plasma membrane level, depending on genotypes. This is an ionic effect of  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{Ca}^{2+}$  activated by light and attenuated by dark. The high increase of loss by KCl and high decline by  $\text{CaCl}_2$ , reported in this paper, suggest that  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  influxes are involved in the increase of loss, whereas  $\text{Ca}^{2+}$  relieved  $\text{Cl}^-$  effect on  $\text{NO}_3^-$  loss by restricting  $\text{Cl}^-$  mobility and uptake. As found in the literature, fluxes of  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$ , which generated water flux, may induce an



osmoregulation in KCl solution thereby facilitating  $\text{NO}_3^-$  efflux as found by walker et al. (2000) for  $\text{K}^+$  and sucrose. Our data of loss in distilled water compared to those of KCl and  $\text{CaCl}_2$  demonstrated that loss of  $\text{NO}_3^-$  is related to turgor regulation as well as probably NR and  $[\text{NO}_3^-]_{\text{cyt}}$  and suggest that loss may be a consequence of  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  uptake in wheat.

Further studies are needed to elucidate these assumptions with special attention to the role of OA in  $\text{NO}_3^-$  efflux mechanism and in the action mechanism of KCl on  $\text{NO}_3^-$  loss. Nevertheless, NR activity with an electrolyte leakage in different osmotic solution of KCl should have been examined to well elucidate the involvement of membrane selectivity and nitrate reduction in the action mechanisms of KCl and water on  $\text{NO}_3^-$  efflux.

## References

- Abdellaoui, A. 2001. Absorption et assimilation de l'azote chez le blé (*Triticum aestivum* L.): mise en évidence d'une régulation de l'efflux des ions  $\text{NO}_3^-$  racinaires par la partie aérienne. Thèse d'Etat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, FES.
- Amtmann, A., Jelitto, T. C., Sanders, D. 1999.  $\text{K}^+$ -selective inward-rectifying channels and apoplastic pH in barley roots. *Plant Physiol.* 119, 331-338.
- Aouad, A., Baaziz, M., Mergoum, M. 1998. Evaluation des peroxydases comme marqueurs dans l'amélioration pour la tolérance à la salinité du blé et d'autres céréales. In: El Mtili, N., (Ed.), Act. J. Sc. sur le Blé Oujda, Maroc, pp. 50-55.
- Aslam, M., Huffaker, R. C., Rain, D. W. 1984. Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. *Plant Physiol.* 76, 321-325.
- Aslam, M., Travis, R. L., Huffaker, R. C. 1995. Effect of pH and calcium on short-term  $\text{NO}_3^-$  flux in root of barley seedling. *Plant Physiol.* 108, 727-734.
- Athwal, G. S., Huber J. L., Huber, S. C. 1998. Phosphorylated nitrate reductase and 14-3-3 proteins. Site of interaction, effects of ions, and evidence for an AMP-binding site on 14-3-3 proteins. *Plant Physiol.* 118, 1041-1048.
- Behl, R., Raschke, K. 1987. Close coupling between extrusion of  $\text{H}^+$  and uptake of  $\text{K}^+$  by barley roots. *Planta* 172, 531-538.
- Beilby, M. J., Walker, N. A. 1981. chloride transport in *Chara*. I. Kinetics and current voltage curves for probable proton symport. *J. Exp. Bot.* 32, 43-54.
- BenDriss Amraoui, M., Malali, A., Talouizte, A. 2000. Salts in the root zone affect  $\text{NO}_3^-$ -N losses from wheat root in light: influence of genotype and darkness. *Cereal Research Communications* 28, 379-386.
- Botella, M. A., Cerdá, A., Lips, S. H. 1994. Kinetics of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  uptake by wheat seedlings. Effect of salinity and nitrogen source. *Plant Physiol.* 144, 53-57.
- Cataldo, D. A., Haroon, M., Schrader, L. E., Youngs, V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6, 71-80.
- Clarkson, D. T. 1986. Regulation of the absorption and release of nitrate by plant cells: a review of current ideas and methodology. In: Lambers, H., Neeteson, J., Stulen, I., (Eds.), *Physiological, ecological and applied aspects of nitrogen metabolism in higher plants.* Nijhoff, M., Dordrecht, pp. 3-27.
- Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., Passama, L. 1995. Diurnal regulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake in

- soybean plants. I. Changes in  $\text{NO}_3^-$  influx, efflux, and N utilization in the plant during the day/night cycle. *J. Exp. Bot.* 46, 1585-1594.
- Deng, M. D., Moureaux, T., Leydecker, M. T., Caboche, M. 1990. Nitrate-reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. *Planta* 180, 281-5.
- Epstein, E. 1980. Responses of plants to saline environments. In: Rains, D. W., Valentine, R. C., Hollaender, A., (Eds), Genetic engineering of osmoregulation. Plenum Press, New York, pp. 7-22.
- Felle, H. H. 1994. The  $\text{H}^+/\text{Cl}^-$  symporter in root-hair cells of *Sinapsis alba*. An electrophysiological study using ion-selective micro-electrodes. *Plant Physiol* 106, 1131-1136.
- Frachisse, J. M., Colcombet, J., Guern, J., Barbier-Brygoo, H. 2000. Characterization of a nitrate-permeable channel able to mediate sustained anion efflux in hypocotyl cells from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 21, 361-371.
- Garrard, L. A., Humphrey, T. E. 1967. The effect of divalent cations on the leakage of sucrose from corn scutellum slices. *Phytochem.* 6, 1085-1095.
- Gossett, D. R., Millhollon, E. P., Cran Lucas, M. 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci.* 34, 706-714.
- Hawkins, H.-J., Lewis, O. A. M. 1993. Effect of NaCl salinity, nitrogen form, calcium and potassium concentration on nitrogen uptake and kinetics in *Triticum aestivum* L. cv. Gamtoos. *New Phytol.* 124, 171-177.
- Humble, G. D., Raschke, K. 1971. Stomatal opening quantitatively related to potassium transport. *Plant Physiol.* 48, 447-453.
- Jarvis, S. C., MacDuff, J. H., Mosquera, A. 1990. Effects of nitrate supply and deprivation and/or defoliation on potassium absorption and distribution in ryegrass. *J. Exp. Bot.* 41, 1-10.
- Johannes, E., Crofts, A., Sanders, D. 1998. Control of  $\text{Cl}^-$  efflux in *Chara corallina* by cytosolic pH, free  $\text{Ca}^{2+}$ , and phosphorylation indicates a role of plasma membrane anion channels in cytosolic pH regulation. *Plant Physiol.* 118, 173-181.
- Kinraide, T. B. 1999. Interactions among  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  in salinity toxicity: quantitative resolution of multiple toxic and ameliorative effects. *J. Exp. Bot.* 50, 1495-1505.
- Kochian, L. V., Lucas, W. J. 1982. Potassium transport in maize roots. Resolution of kinetics into a saturable and linear component. *Plant Physiol.* 70, 1723-1731.
- Kochian, L. V., Lucas, W. J. 1988. Potassium-transport in roots. *Adv. Bot. Res.* 15, 93-178.
- MacKintosh, C., Douglas, P., Lillo, C. 1995. Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant*

- Physiol. 107, 451-457.
- Marschner, H. 1986. Functions of mineral nutrients: macronutrients. In Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London, pp. 195-267.
- Maathuis, F. J. M., Ichida, A. M., Sanders, D., Schroeder, J. I. 1997. Roles of higher plant K<sup>+</sup> channels. Plant Physiol. 114, 1141-1149.
- McLay, C. D. A., Cameron, K. C., McLaren, R. G. 1991. Effect of time of application and continuity of rainfall on leaching of surface-applied nutrients. Aust. Soil Res. 29, 1-9.
- Minotti, P. L., Williams, D. C., Jackson, W. A. 1968. Nitrate uptake and reduction as affected by calcium and potassium. Soil Sci. Amer. Proc. 32, 692-698.
- Moya, J. L., Primo-Millo, E., Talon, M. 1999. Morphological factors determining salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. Plant Cell Environ. 22, 1425-1433.
- Navari-Izzo, F., Izzo, R., Bottazzi, F., Ranieri, A. 1988. Effects of water stress and salinity on sterols in *Zea mays* roots. Phytochem. 27, 3109-3115.
- Olmos, E., Hernandez, J. A., Sevilla, F., Hellin, E. 1994. Induction of several antioxidant enzymes in the selection of salt tolerant cell line of *Pisum sativum*. J. Plant Physiol. 144, 594-598.
- Ourry, A., Meslé, S., Boucaud, J. 1992. Effects of osmotic stress (NaCl and polyethylene glycol) on nitrate uptake, translocation, storage and reduction in ryegrass (*Lolium perenne* L.). New Phytol. 120, 275-280.
- Peuke, A., Jeschke, W. D. 1999. The characterization of inhibition of net nitrate uptake by salt in salt-tolerant barley (*Hordeum vulgare* L. cv. California Mariout). J. Exp. Bot. 50, 1365-1372.
- Peuke, A. D., Glaab, J., Kaiser, W. M., Jeschke, W. D. 1996. The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. IV. Flow and metabolism of inorganic nitrogen and malate depending on nitrogen nutrition and salt treatment. J. Exp. Bot. 47, 377-385.
- Poole, R. J. 1988. Plasma membrane and tonoplast. In: Baker, D. A., Hall, J. L., (Eds), Solute transport in plant cells and tissues. Wiley, New York, pp 83-105.
- Rufty, T. W., Jackson, W. A., Raper, C. D. 1981. Nitrate reduction in roots as affected by the presence of potassium and by flux of nitrate through the roots. Plant Physiol. 68, 605-609.
- Sacchi, G. A., Abruzzese, A., Lucchini, G., Fiorani, F., Cocucci, S. 2000. Efflux and active re-absorption of glucose in roots of cotton plants grown under saline conditions. Plant Soil 220, 1-11.
- Scaife, A., Schloemer, S. 1994. The diurnal pattern of uptake and reduction by spinach (*Spinacia oleracea* L.). Ann. Bot. 73, 337-343.
- Siebrecht, S., Tischner, R. 1999. Changes in the xylem exudate composition of poplar (*P. tremula* x *P. alba*)-dependent on the nitrogen and potassium supply. J. Exp. Bot. 50, 1797-1806.
- Smith, F. A. 1973. The internal control of nitrate uptake into excised barley roots with differing salt contents. New Phytol. 72, 767-782.
- Touraine, B., Gojon, A. 1997. Intégration de l'absorption du nitrate dans la plante. In: Morot-

- Gaudry, J.-F., (Ed.), Assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique, biochimique et moléculaire. INRA, Paris, pp. 109-128.
- Touraine, B., Grignon, N., Grignon, C. 1988. Charge balance in  $\text{NO}_3^-$ -fed soybean. Estimation of  $\text{K}^+$  and carboxylate recirculation. *Plant Physiol.* 88, 605-612.
- Triplett, E. W., Barnett, N. M., Blevins, D. G. 1980. Organic acids and ion balance in xylem exudates of wheat during nitrate and sulfate absorption. *Plant Physiol.* 65, 610-613.
- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K., Kobayashi, H. 1999. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* 11, 1195-1206.
- Yeo, A. R., Flowers, T. J. 1994. Soil mineral stresses. Approaches to crop improvement. Monographs on Theoretical and Applied Genetics. Vol. 21. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Walker, N. A., Zhang, W.-H., Harrington, G., Holdaway, N., Patrick, J. W. 2000. Effluxes of solutes from developing seed coats of *Phaseolus vulgaris* L. and *Vicia faba* L.: locating the effect of turgor in a coupled chemiosmotic system. *J. Exp. Bot.* 51, 1047-1055.
- Ward, M. R., Aslam, M., Huffaker, R. C. 1986. Enhancement of  $\text{NO}_3^-$  uptake and growth of barley seedlings by calcium under saline conditions. *Plant Physiol.* 80, 520-524.
- Wang, X., Iino, M. 1998. Interaction of cryptochrome 1, phytochrome, and ion fluxes in blue-light-induced shrinking of *Arabidopsis* hypocotyls protoplasts. *Plant Physiol.* 117, 1265-1279.
- Zhang, W.-H., Atwell, B. J., Patrick, J. W., Walker, N. A. 1996. Turgor-dependent efflux of assimilates from coats of developing seed of *Phaseolus vulgaris* L.: water relations of the cells involved in efflux. *Planta* 199, 25-33.

## **CHAPITRE 6**

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup> affects carbohydrate losses from wheat roots**

Mohammed BenDriss Amraoui, and Ahmed Talouizte

Laboratory of plant physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar el Mehraz,  
P.O. Box 1796, Atlas, Fès, Morocco

Les résultats de ce chapitre sont présentés tels qu'ils ont été publiés dans Acta Agronomica  
Hungarica, Volume 49, Numéro 1, pp. 43-52 (2001).

Corresponding author: BenDriss Amraoui Mohammed, Laboratoire de Physiologie végétale,  
Département de Biologie, Faculté des Sciences Dhar el Mehraz B.P. 1796, Atlas, Fès, Maroc.

Telephone & Fax: (212) 055-73-29-81

E-mail: msms\_60@hotmail.com

### Résumé

L'influence du  $\text{NO}_3^-$  sur les pertes de sucres (S) à partir des racines de plantules de blé de 21 jours a été étudiée à la lumière sous différentes disponibilités en azote (0 à 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ ). La perte de S n'est pas influencée par la quantité interne de sucres solubles (SS), mais est affectée par le statut en nitrate des plantules. A faible éclaircissement, la perte en  $\text{NO}_3^-$  est significativement plus élevée que celle à fort éclaircissement, tandis que la perte de S est significativement plus élevée à fort éclaircissement qu'à faible éclaircissement, en dépit d'une faible différence en concentration de SS dans les racines à 0 h entre les plantules des deux traitements d'éclaircissements, suggérant l'existence d'une corrélation négative entre l'efflux du  $\text{NO}_3^-$  et des S et une étroite relation entre le système de l'efflux des S et l'assimilation du  $\text{NO}_3^-$ . La perte des S est plus diminuée par la faible disponibilité en  $\text{NO}_3^-$  que par le faible éclaircissement, indiquant que la perte de S est plus dépendante de  $\text{NO}_3^-$  que de l'export des S. La diminution importante de la perte de S, malgré qu'il y a augmentation de l'efflux du  $\text{NO}_3^-$  (à faible éclaircissement) ou diminution de l'efflux du  $\text{NO}_3^-$  (à faible disponibilité en  $\text{NO}_3^-$ ) indique que les deux types d'efflux impliquent des mécanismes différents.

**Mots clés:** efflux des S; efflux du  $\text{NO}_3^-$ ; statut nitrate; accumulation des S; carence en N



### Abstract

The influence of  $\text{NO}_3^-$  on carbohydrate (C) losses from the roots of 21-day-old wheat seedlings was studied under light and N supplies ranging from deficient to excessive (0–8 mM  $\text{NO}_3^-$ ). C loss is not influenced by the quantity of internal soluble carbohydrates (SC), but is affected by the nitrate status of the seedlings. In low illuminance, the  $\text{NO}_3^-$  loss is significantly higher than that in high illuminance, whereas C loss is significantly higher in high illuminance than in low illuminance, in spite of there being little difference between the seedlings of both light treatments in the SC concentration in the roots at 0 h, suggesting the existence of a negative correlation between  $\text{NO}_3^-$  and C efflux and a close relationship between the C efflux system and  $\text{NO}_3^-$  assimilation. Low  $\text{NO}_3^-$  and light reduced the C loss, which was decreased to a greater extent by low  $\text{NO}_3^-$  than by low light, indicating that C loss was more dependent on  $\text{NO}_3^-$  than on C export. The high decline in C loss, in spite of whether there is an increase in  $\text{NO}_3^-$  loss (i.e. in low light) or a decrease in  $\text{NO}_3^-$  loss (i.e. at low nitrate), may indicate that the two types of losses involve different mechanisms.

**Key words:** C efflux,  $\text{NO}_3^-$  efflux, nitrate status, C accumulation, N starvation

## Introduction

It is well established that the carbon and nitrogen metabolisms are linked, because they must share organic carbon and energy supplied directly from photosynthesis or from the respiration of fixed carbon (Talouizte et al., 1984a; Van Quy et al., 1991; Van Quy and Champigny, 1992; Huppe and Turpin, 1994; Champigny, 1995; Améziane et al., 1997). It has been found that the capacity of wheat roots to assimilate nitrogen is correlated directly with their C status, and the carbon skeletons for nitrogen assimilation derive from the stored carbon (Champigny and Talouizte, 1986). There is increasing evidence that  $\text{NO}_3^-$  considerably influences the source-sink relations and sucrose metabolism in roots (Pollock and Cairns, 1991; Améziane et al., 1997). Most research on nitrogen effects has been performed on anaplerotic  $\text{CO}_2$  fixation and sucrose synthesis. It is known, for example, that Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPcase, EC 4.1.1.31) is activated and sucrose phosphate synthase (SPS, EC 2.4.1.14) activity is decreased (Van Quy et al., 1991; Champigny, 1995), but very little is known about the integration of the C catabolism into the nitrogen metabolism and its regulation by N in sink tissues (Stitt and Steup, 1985; Pollock and Cairns, 1991; Huppe and Turpin, 1994; Champigny, 1995). Little is also known about the destiny of the hexose formed either during fructan synthesis (Pollock and Cairns, 1991) or during sucrose, fructan and starch degradation. It is believed that sucrose synthesis occurs from free hexose in sink tissues as well as in source leaves because of the relatively low tissue contents (Wagner et al., 1983; Lucas and Madore, 1988), but the magnitude of such recycling and the effect of nitrogen on this process have not been well understood. In tubers of *H. tuberosus*, Pollock and Chatterton (1988) found that chilling induced a net depolymerization of fructan with no net C loss, indicating resynthesis of short-chain fructan acceptors. It has also been found that N deprivation increases sucrose-sucrose fructosyl transferase (SST, EC 2.4.1.99) activity and probably fructan synthesis (Améziane et al., 1997), but to our knowledge little is known about the recycling and loss of C during fructan synthesis in N-limited conditions or about the possible relationships between the  $\text{NO}_3^-$  metabolism and C loss in wheat in response to N enrichment. Since  $\text{NO}_3^-$  may affect the export and storage of C and tissue sink strength, it may eventually affect, in accordance with its concentration in the middle and with light intensity, the composition, patterns and rates of C release from the roots, the effects of which are well known to be a basic character of mycorrhizal symbiosis (Martin et al., 1987), but whose physiological significance and mechanism are not well known (Bush, 1993). The hypothesis that  $\text{NO}_3^-$  supply will affect the destiny of C in wheat roots is tested by determining the

concomitant C and  $\text{NO}_3^-$  losses from (1) seedlings grown at three levels of  $\text{NO}_3^-$  supplies ranging from deficient to luxurious at high light level and from (2) seedlings grown on  $\text{NO}_3^-$  at low light level. The aim of the present paper was to examine the effect of  $\text{NO}_3^-$  and light intensity on the C efflux from roots.

## Materials and methods

### Plant material and growing conditions

Wheat seeds (*Triticum aestivum* L., var. Saba) disinfected for 5 min in sodium hypochlorite (37 g/l) were soaked for 8 h in distilled water and then allowed to germinate for 7 days on moist cheesecloth in darkness at 18 to 20°C. Seedlings were planted in groups of 25 in plastic holders and placed in 5 litres  $\text{NO}_3^-$  solution. The  $\text{NO}_3^-$  solution at pH 5.5 contained 3 mM  $\text{KNO}_3$ , 2.5 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.75 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 mM  $\text{NaCl}$ , 0.75 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 6  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 48.5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 16.5  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  and 0.5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . Iron was added as 10 mg of  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA per litre of  $\text{NO}_3^-$  solution. The solutions were constantly aerated and changed every three days. Growth was carried out in a controlled chamber where light was applied during a 16 h photoperiod by white fluorescent bulbs (mixolamp 160W) and tubes (40W). The temperature was maintained at 21°C in the light period and 18°C in the dark period. Relative humidity was about 65 %.

### Nitrogen and light treatments

In the high N treatment (+N), seedlings were constantly grown on  $\text{NO}_3^-$  solution for 14 days at low illuminance (LI) 2000 or high illuminance (HI) 4000 lux at pot level. In the 10d(-N) treatment, 4 days after planting out into  $\text{NO}_3^-$  nutrient solution at 4000 lux, seedlings were transferred for 10 days at 4000 lux onto N-free nutrient solution similar to the complete solution except that 3 mM  $\text{KCl}$  and 2.5 mM  $\text{CaSO}_4$  were used to replace the  $\text{NO}_3^-$  salts. In the 21d(-N) treatment, after 7 days of germination, seedlings were constantly grown on N-free nutrient solution for 14 days at 4000 lux.

### Plant treatments

On the 21<sup>st</sup> day after soaking, 3 h after the start of the light period, four intact plant roots were rinsed three times with distilled water and placed under the same illuminance used for growth in a test tube containing 40 ml of distilled water, at pH 5.5. The solution was constantly aerated. At the end of the first sampling period, the roots were placed in another 40 ml of distilled water for another period. The sequence was continued through 8 h and the medium was changed after each period. Seedlings were sampled at the beginning and end of the experimental period (8 h); roots and shoots were excised, dried and weighed. Tissue nitrate and SC before and after transfer of seedlings (at 0 h) to bathing solution were extracted from root and shoot separately with a cold methanol: chloroform:  $\text{H}_2\text{O}$  (12: 5: 3 v/v/v) mixture according to Talouizte et al. (1984b). Exudates from the roots to water at different times were concentrated separately in 2 ml of distilled water. The  $\text{NO}_3^-$ -N content of tissues and root

exudates were determined with the method of Cataldo et al. (1975). SC of tissues and C of root exudates were assayed by the anthrone method (Halhoul and Kleinberg, 1972) and expressed as glucose equivalent. In the figures, SC and C loss are given as  $\mu\text{g}$  glucose per root dry weight and  $\text{NO}_3^-$  as  $\mu\text{g NO}_3^- \text{-N}$  per root dry weight.

### **Data analysis**

The data were analysed by ANOVA (analysis of variance) to prove the significant difference between the treatments. Standard errors were calculated for all means and where no error bars appear, the standard error falls within the size of the symbol. For each treatment four repetitions (each of four plants) were made. For each repetition root exudates were collected during 0–8 h from the same plants. Each point of graph represents a single sampling time and is the mean of four repetitions with measurements made on different plants.

## Results and discussion

Roots must use different strategies than do photosynthetic tissues to support N assimilation because translocated photosynthates provide both carbon skeletons and all the energy to roots and hence regulation is required to prevent potential competition between  $\text{NO}_3^-$  assimilation and other metabolic pathways (for example:  $\text{NO}_3^-$ /sucrose synthesis). The assimilation of  $\text{NO}_3^-$  by the roots may require the regulation of the synthesis, translocation and supply of photosynthates, together with organic acids, to the mitochondria (Weger and Turpin, 1989; Bloom et al., 1992; Huppe and Turpin, 1994; Améziane, 1997). In the roots, photosynthates may be degraded, stored in the vacuole or leaked out (Wagner et al., 1983; Martin et al., 1987; Pollock and Cairns, 1991; Bush, 1993). Roots are known to continuously exude several compounds, i.e. organic acids, carbohydrates and amino acids (Martin et al., 1987). The composition and the physiological significance of root exudates have been extensively investigated in tree mycorrhizae studies (Martin et al., 1987), but less research has been done on cereals (Gransee and Wittenmayer, 2000) and on the regulation and integration of this process in the root nitrogen metabolism.

Nitrogen deficiency increases the accumulation of SC (Fig. 1). This may be due to low SC degradation related to low  $\text{NO}_3^-$  assimilation and synthesis of amino acids (Rufty et al., 1988; Weger and Turpin, 1989; Bloom et al., 1992). It may also be due to (1) the recycling of C formed either during C degradation or during fructan synthesis, which increases under N-limited conditions (Améziane et al., 1997), (2) the use of organic acids as respiratory substrates instead of C, (3) the loss of respiratory enzymes or mitochondria and (4) a decrease in the C permeability of root membranes. The root SC does not increase in 10d(-N) seedlings, whereas it significantly increases when the seedlings have never received  $\text{NO}_3^-$  (i.e. in 21d(-N) seedlings).

In contrast to this, the shoot SC significantly increases in all (-N) seedlings, indicating that the shoot carbon metabolism was probably more affected by N starvation than that of the roots (Fig. 1). This result may indicate that in 10d(-N) seedlings, probably neither excess C export from the shoots to the roots nor a decline in respiratory C degradation in the roots occurred during N starvation. However, during the 8-h experiment, the shoots accumulated 88, 95.6 and 39 % of initial shoot SC (at 0 h), whereas the roots accumulated 34, 87 and 36 % of initial root SC (at 0 h) in (+N), 10d(-N) and 21d(-N) seedlings, respectively. This shows that even if the roots of 10d(-N) seedlings accumulated 87 % of the initial root SC they could

not store it in their vacuoles because at 0 h the low root SC contents found in these seedlings were similar to that of (+N) seedlings at the same time (0 h).

A high proportion of the C quantity (87 %) translocated to the roots in these seedlings will probably be consumed by respiration in the later dark period, suggesting fewer change in their root respiration during starvation. It may also show that in 21d(-N) seedlings, even if photosynthesis was decreased by N starvation, the shoots were able to maintain C export to the roots. On the other hand, if we compare the SC of (-N) seedlings to that of (+N) seedlings, we find that even if 21d(-N) seedlings appear to accumulate more SC during N starvation, they do not export more C to the roots than (+N) and 10d(-N) seedlings during 8 h, indicating probably high alterations in their root respiration caused by starvation (Fig. 1).

This result may indicate that the increase in root SC during starvation may stem from an increase in C exports and changes in respiration, but probably also from other processes. However, although it has been observed that the carbon export (efflux) from source leaves depends on their sucrose concentration (Ho, 1988), the present data show that here C loss from the roots is little or not influenced by the size of the internal SC content but is more dependent on the nitrogen status of the seedlings (Fig. 2A). (+N) seedlings, which showed low C accumulation and also low C export into roots during 8 h, lost a higher quantity of C compared to (-N) seedlings, indicating that C loss is very sensitive to N availability (Figs. 1 and 2A).

In contrast to this, it has been reported that the total amount of carbon recovered in the root exudates decreases by increasing N fertilization (Kuz'yakov and Domanski, 2000) and is controlled by the availability of N and carbon substrates in the root (Lemaire and Millard, 1999). They have also reported that the carbon-replete plants whose growth is N-limited have an increased allocation of carbon to roots and a greater rate of exudation of carbon substrates compared to plants grown with a carbon-limitation, suggesting that here (-N) seedlings have probably leaked in high part an other carbon compound instead of carbohydrate. More detailed analysis is needed to investigate this possibility. However, the high decline in C loss from (-N) seedlings, which ranged from 86 to 91 % of the C loss from (+N) seedlings, indicates that the increase in root SC by N starvation may also be due to changes in C loss. These may not be entirely due to a decline in respiration here: since N starvation induces an increase in root intra-cellular C content and root growth, the respiration may not be drastically decreased because it must provide the energy and carbon skeletons required for root growth. Furthermore, the fact that the roots of 10d(-N) seedlings lost few C during 8 h (Fig. 2A) even if their SC are similar to that of (+N) seedlings, probably due to fewer changes in root

respiration, suggests that the lower C loss from the roots may also be due to the inactivation or degradation of the membrane protein responsible for the C efflux caused by N starvation as reported for  $\text{NO}_3^-$  efflux by Van der Leij et al. (1998).

In contrast to this, the high C loss from (+N) seedlings was probably due to the maintenance of high C loss system activity induced by a concomitant increase in sucrose degradation and decrease of fructan synthesis and C recycling caused by the nitrate-induced decrease in SPS and SST activities in the roots as found for SPS in leaves (Van Quy and Champigny, 1992; Champigny, 1995). The stimulation of C loss by  $\text{NO}_3^-$  supply and the decline caused by N starvation confirm the hypothesis that the rate of biosynthesis (processes utilizing ATP: nitrate assimilation), rather than C, is the main limiting factor for the supply of C to the mitochondria and for respiration (Journet et al., 1986) and probably also for the synthesis and activity of the C efflux system.

On the other hand, an increase of respiratory oxidation of C and condensation of simple C into polysaccharides were showed in (-N) wheat seedlings (Talouizte et al., 1984a). Additionally, an increase in the malate concentration was also observed in the vicinity of the root tips in response to N starvation (Stumpf and Burris, 1981). However, in (+N) seedlings few organic acids (OA) are likely to be stored, because they may be used to buffer the  $\text{OH}^-$  generated during nitrate reduction and to replace  $\text{NO}_3^-$  anion for charge balancing.

Recently, Gransee and Wittenmayer (2000) found that the proportion of C and OA in root exudates vary with plant species and growth stage. They have also found that during plant development the relative amount of C decreased at the expense of OA, suggesting that the C efflux system was very active at very early growth stages. These observations suggest that here in (-N) seedlings, OA may replace C as the respiratory substrate, leading to a decline in C loss and increase in OA loss. They may also suggest that the change in the kind of respiratory substrate and the extent to which this replacement occurs in relation to N supply are probably linked to the synthesis and activity of the C efflux system.

However, if here it is assumed that in (-N) seedlings OA are the main respiratory substrates, the C loss from these seedlings is likely to be due to fructan synthesis and C recycling or to the low respiration rate if the C efflux channel remains active. Taken together, these results suggest that in the presence of  $\text{NO}_3^-$ , either the decrease of root fructan and OA synthesis or the increase of respiration, sucrose degradation and the C efflux system activity in roots, singly and/or in interaction, may increase C loss, but the contribution of each of these factors to variations in C loss cannot be determined here.



Since C loss was affected by the  $\text{NO}_3^-$  supply and probably by membrane permeability, is it linked to  $\text{NO}_3^-$  efflux? To reply to this question, the variation in  $\text{NO}_3^-$  efflux in root exudates was also investigated. However, when C and  $\text{NO}_3^-$  releases are compared, it is found that  $\text{NO}_3^-$  loss, as for C loss, follows internal nitrate contents and is thus relatively important for (+N) seedlings but not at all so for 10 and 21d(-N) seedlings (Figs. 2A, 2B and 3). Loss of  $\text{NO}_3^-$  from (+N) seedlings increased slowly and remained lower than that of C, whereas for all (-N) seedlings losses of C and  $\text{NO}_3^-$  were very low, suggesting the existence of a relationship between losses of  $\text{NO}_3^-$  and C. What, then, happens to C loss if  $\text{NO}_3^-$  loss increases? Is it increased by  $\text{NO}_3^-$  loss?

To test the hypothesis that C and  $\text{NO}_3^-$  losses are linked, they were compared under two light intensities (low, LI, and high HI, illuminance) as described in the Materials and methods section. The effect of low  $\text{NO}_3^-$  assimilation (i.e. increased  $\text{NO}_3^-$  loss) was also tested here without altering the  $\text{NO}_3^-$  supply or, probably, the membrane structure and permeability. However, during 0–8 h, seedlings exposed to HI accumulated relatively high amounts of SC, whereas at LI, seedlings did not accumulate SC (Fig. 4), indicating low SC formation and hence low translocation from the shoots to the root in LI, leading to low  $\text{NO}_3^-$  assimilation and thus to a high accumulation of  $\text{NO}_3^-$  in the tissues (Fig. 5).

The question is, whether this increase in root  $\text{NO}_3^-$  content induces a concomitant increase in C and  $\text{NO}_3^-$  losses in spite of the decline in  $\text{NO}_3^-$  assimilation, and from what compartment the effluxed C comes.  $\text{NO}_3^-$  loss from LI seedlings was significantly higher than that from HI seedlings, whereas C loss was significantly higher at HI than at LI, in spite of there being little difference between HI and LI seedlings in root SC concentration at 0 h, suggesting a negative correlation between  $\text{NO}_3^-$  and C efflux (Figs. 4 and 6).

Robinson and Baysdorfer (1985), Weger and Turpin (1989) and Bloom et al. (1992) have reported a close relationship between  $\text{NO}_3^-$  efflux and light, between  $\text{NO}_3^-$  efflux and C and between  $\text{NO}_3^-$  efflux and respiration via nitrate assimilation. It is well known that a reduction in light intensity may cause a substantial decrease in photosynthesis and C translocation, leading to the depletion of the intra-cellular C content and a subsequent decrease in respiration (Saglio and Pradet, 1980). The high increase in C loss associated with a high decline in  $\text{NO}_3^-$  loss at HI, in spite of there being little difference between the root SC contents of HI and LI seedlings at 0 h, suggests that at LI it is the low C export which affects C loss by decreasing the  $\text{NO}_3^-$  assimilation through a diminution of the current photosynthates degradation and carbon supply to the mitochondria. This may eventually also decrease C loss by closing the C efflux channel and/or by stimulating hexose recycling during

the use of reserves by respiration. However, the degree to which current photosynthates or stored assimilates can be used in this process will require much more research with  $^{14}\text{C}$  tracers to determine the distribution of current photosynthates between C loss and storage pools in the roots.

Finally, the present data indicate that C loss was dependent on both light and  $\text{NO}_3^-$  pre-treatment via nitrate assimilation (Figs. 2 and 6). Low  $\text{NO}_3^-$  and light reduced C loss. C loss was decreased to a greater extent by low  $\text{NO}_3^-$  than by low light, indicating that C loss was more dependent on nitrate than on C export. The high decline in C loss in spite of an increase or decrease in  $\text{NO}_3^-$  loss, reported in this paper, may indicate that the two types of losses involve different mechanisms. Further studies on respiration, fructan synthesis (including hexose recycling) and organic acid synthesis in roots in relation to the nitrate supply may contribute to the elucidation of these assumptions and to a better understanding of the mechanism of the carbohydrate efflux system.

## References

- Améziane, R., Deléens, E., Noctor, G., Morot-Gaudry, J.-F., Limami, M. A. 1997. Stage of development is an important determinant in the effect of nitrate on photoassimilate ( $^{13}\text{C}$ ) partitioning in chicory (*Cichorium intybus*). J. Exp. Bot. 48, 25-33.
- Bloom, A. J., Sukrapanna, S. S., Warner, R. L. 1992. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. Plant Physiol. 99, 1294-1301.
- Bush, D. R. 1993. Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 513-542.
- Cataldo, D. A., Haroon, M., Schrader, L. E., Youngs, V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 6, 71-80.
- Champigny, M. L. 1995. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. Photosynthesis Research 46, 117-127.
- Champigny, M. L., Talouizte, A. 1986. Dependence of nitrate reduction on root soluble carbohydrates in wheat seedlings. In: Lambers, H., Neeteson, J. J., Stulen, I., (Eds), Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster, pp. 279-282.
- Gransee, A., Wittenmayer, L. 2000. Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. J. Plant Nutr. Soil Sci. 163, 381-385.
- Halhoul, M. N., Kleinberg, I. 1972. Differential determination of glucose and fructose, and glucose and fructose yielding substances with anthrone. Anal. Biochem. 50, 337-343.
- Ho, L. C. 1988. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 355-378.
- Huppe, H. C., Turpin, D. H. 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 577-607.
- Journet, E. P., Bligny, R., Douce, R. 1986. Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. J. Biol. Chem. 261, 3193-3199.
- Kuzyakov, Y., Domanski, G. 2000. Carbon input by plants into the soil. Review. J. Plant Nutr. Soil Sci. 163, 421-431.
- Lemaire, G., Millard, P. 1999. An ecophysiological approach to modelling resource fluxes in competing plants. J. Exp. Bot. 50, 15-28.
- Lucas, W. J., Madore, M. A. 1988. Recent advances in sugar transport. In: Preiss, J., (Ed.),

- The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Vol. 14. Carbohydrates. Academic Press, San Diego, London, pp. 35-84.
- Martin, F., Ramstedt, M., Söderhäll, K. 1987. Carbon and nitrogen metabolism in ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *Biochimie* 69, 569-581.
- Pollock, C. J., Cairns, A. J. 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 77-101.
- Pollock, C. J., Chatterton, N. J. 1988. Fructans. In: Preiss, J., (Ed.), The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Vol. 14. Carbohydrates. Academic Press, San Diego, London, pp. 109-140.
- Robinson, J. M., Baysdorfer, C. 1985. Interrelationships between photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in mature soybean leaves and isolated leaf mesophyll cells. In: Heath, R. L., Preiss, J., (Eds), Regulation of carbon partitioning in photosynthetic tissue. *Am. Soc. Plant Physiol*, Rockville M. D, pp. 333-357.
- Rufty, T. W., Huber, S. C., Volk, R. J. 1988. Alterations in leaf carbohydrate metabolism in response to nitrogen stress. *Plant Physiol.* 88, 725-730.
- Saglio, P. H., Pradet, A. 1980. Soluble sugars, respiration, and energy charge during aging of excised maize root tips. *Plant Physiol.* 66, 516-519.
- Stitt, M., Steup, M. 1985. Starch and sucrose degradation. In: Douce, R., Day, D., (Eds), Higher plant respiration. Springer verlag, Berlin, pp. 347-390.
- Stumpf, D. K., Burris, R. H. 1981. Organic acid contents of soybean: age and source of nitrogen. *Plant Physiol.* 68, 989-991.
- Talouizte, A., Champigny, M. L., Bismuth, E., Moyse, A. 1984a. Roots carbohydrate metabolism associated with nitrate assimilation in wheat previously deprived of nitrogen. *Physiol. Vég.* 22, 19-27.
- Talouizte, A., Guiraud, G., Moyse, A., Marol, C., Champigny, M. L. 1984b. Effect of previous nitrate deprivation on <sup>15</sup>N-nitrate absorption and assimilation by wheat seedlings. *J. Plant Physiol.* 116, 113-122.
- Van der Leij, M., Smith, S. J., Miller, A. J. 1998. Remobilisation of vacuolar stored nitrate in barley root cells. *Planta* 205, 64-72.
- Van Quy, L., Champigny, M. L. 1992. NO<sub>3</sub><sup>-</sup> enhances the kinase activity for phosphorylation of phosphoenol pyruvate carboxylase and sucrose phosphate synthase proteins in wheat leaves. *Plant Physiol.* 99, 344-347.
- Van Quy, L., Lamaze, T., Champigny, M. L. 1991. Short-term effects of nitrate on sucrose synthesis in wheat leaves. *Planta* 185, 53-57.

- Wagner, W., Keller, F., Wiemken, A. 1983. Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles. *Z. Pflanzen-physiol.* 112, 359-372.
- Weger, H. G., Turpin, D. H. 1989. Mitochondrial respiration can support  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  reduction during photosynthesis. *Plant Physiol.* 89, 409-415.

## **CHAPITRE 7**

**Influence of genotype and salt at physiological concentration on the shoot control of root  $\text{NO}_3^-$  efflux**

Mohammed BenDriss Amraoui, Asmae Malali, and Ahmed Talouizte

Laboratory of plant physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar el Mehraz,

P.O. Box 1796, Atlas, Fès, Morocco

Les résultats de ce chapitre sont présentés tels qu'ils ont été soumis pour publication dans  
European Journal of Agronomy

Corresponding author: BenDriss Amraoui Mohammed, Laboratoire de Physiologie végétale,  
Département de Biologie, Faculté des Sciences Dhar el Mehraz B.P. 1796, Atlas, Fès, Maroc.

Telephone & Fax: (212) 055-73-29-81

E-mail: msms\_60@hotmail.com

### Résumé

L'effet du génotype, de la partie aérienne, et des sels sur l'efflux du  $\text{NO}_3^-$  (E) a été étudié dans quatre conditions différentes: plantules intactes (PI), racines excisées (RE), plantules décapitées (PDC) et plantules défoliées (PDF). Les résultats obtenus montrent que RE affecte légèrement l'efflux chez Achtar et Tegye32, mais diminue fortement chez Saâda et Saba comparé à PI. Cette diminution est observée aussi chez PDC pour Saâda et Saba. Une augmentation de E est obtenue chez PDC pour Tegye32 mais aucun effet n'est observé chez Achtar. Sur sel à la lumière, PDF augmente significativement E chez Saâda seulement. Sur eau à la lumière, PDF augmente significativement E pour Saâda et Saba, diminue significativement pour Achtar et légèrement pour Tegye32. Sur sel à l'obscurité, PDF diminue significativement E pour Saâda, Saba et Tegye32 et augmente légèrement pour Achtar. Sur eau à l'obscurité, PDF diminue significativement E pour Saâda mais augmente significativement pour Saba et affecte légèrement E pour Achtar et Tegye32. Ces résultats montrent que E est réduit par les feuilles et stimulé par la feuille 4 et l'apex. L'activité de la feuille 4 et l'apex est beaucoup plus atténuée par les sels et stimulée par la lumière et les feuilles 1 et 2 pour Saâda et Saba, indiquant que les sels affectent les signaux chimiques foliaires auxquels l'efflux est sensible. L'ampleur de ce contrôle par la partie aérienne est élevée chez Saâda et Saba et faible chez Achtar et Tegye32, suggérant que les racines aussi bien que la partie aérienne sont impliquées dans le contrôle interne de E. Ces résultats et d'autres tirés de la littérature supportent l'idée que le contrôle du système de l'efflux est complexe étant donné qu'il peut être influencé par plusieurs facteurs.

**Mots clés:** feuilles; apex; efflux du  $\text{NO}_3^-$ ; génotype; sels; blé



### Abstract

The effect of genotype, shoots and salts on  $\text{NO}_3^-$  efflux (E) was studied, using four experimental treatments: intact seedlings (IS), excised roots (ER), decapitated seedlings (DCS), and defoliated seedlings (DFS). Data show that ER affects slightly E for Achtar and Tegye32, but decreases highly for Saâda and Saba compared to IS. E reduction in DCS is also found for Saâda and Saba. E increase is obtained in DCS for Tegye32 but no effect is observed for Achtar. In salt-light, DFS increases significantly E only for Saâda. In water-light, DFS increases significantly E for Saâda and Saba, decreases significantly for Achtar and slightly for Tegye32. In salt-dark, DFS decreases significantly E for Saâda, Saba and Tegye32 and increases slightly for Achtar. In water-dark, DFS decreases significantly E for Saâda but increases significantly for Saba and slightly affects for Achtar and Tegye32. These data indicate that the leaves reduce E but the leaf 4 and apex stimulate E. The activity of leaf 4 and apex is much more attenuated by salt and stimulated by light and leaves 1 and 2 for Saâda and Saba, indicating that salt affects the shoot chemical signals to which E is sensitive. The relative size of this shoot control is high in Saâda and Saba and low in Achtar and Tegye32, suggesting that roots as well as shoot are involved in the internal regulation of E. These data and other extracted from the literature support the idea that the E carrier control in plant is complex since it may be influenced by several factors.

**Key words:** leaves; apex;  $\text{NO}_3^-$  efflux; genotype; salts; wheat

## Introduction

$\text{NO}_3^-$  uptake is closely correlated to the growth of shoots in higher plant (Rodgers and Barneix, 1989). N-deprivation increases the capacity of root  $\text{NO}_3^-$  uptake (Talouizte et al., 1984). At non limiting N conditions  $\text{NO}_3^-$  uptake is under control of internal regulating mechanisms (Ismande and Touraine, 1994; Ter Steege et al., 1999). Studies in the past ten years and earlier research by Clarkson (1986) show that the model of pump and leak (Scaife, 1989) is not adequate to explain the underlying biological complexity of uptake regulation. It seems that uptake is the net result of nitrate influx and efflux, which are regulated independently (Aslam et al., 1995; Clarkson, 1986). However, little information is available on the complex interactions between nitrate influx and efflux and the role of either flux in uptake control is still a matter of debate. Several studies showed that alteration in uptake can entirely be due to changes in influx (Glass et al., 1985; Lee and Drew, 1989; Siddiqi et al., 1990; Lee, 1993), while other works revealed that changes of uptake may be explained by variation of efflux (Deane-Drummond, 1986).

Much effort has been devoted toward understanding the mechanism and genetic of  $\text{NO}_3^-$  influx with the eventual goal of improving our knowledge about the control of uptake (Tsay et al., 1993; Aslam et al., 1995; Muller et al., 1995; Muldin and Ingemarsson, 1995; Huang et al., 1996; Huang et al., 1999; Kronzucker et al., 1999; Liu et al., 1999; Gazzarrini et al., 1999; Lin et al., 2000). However, although many studies have contributed to understanding uptake regulation, data on this event in higher plant roots are still lacking (Deane-Drummond, 1986; Zhang and MacKown, 1993; Aslam et al., 1995; Ter Steege et al., 1999). Similarly, even if we know that uptake is repressed by signal of N satiety, and stimulated by signal of N-deprivation (Ismande and Touraine, 1994), one cannot well know whether these signals are primarily upon influx or efflux.

Several external and internal factors have been found to affect uptake (Casadesus et al., 1995; Ismande and Touraine, 1994; MacDuff et al., 1994), however, the factors by which plant adapts uptake to global N demand remain unknown. Amino acids and organic acids have been suggested to be involved in information exchange between root and shoot via phloem transport (Muller and Touraine, 1992; Touraine et al., 1992; Lainé et al., 1995; Delhon et al., 1995b). It was found that amino acids reduce uptake by their accumulation in root (Muller and Touraine, 1992), whereas malic acid increases directly uptake (Touraine et al., 1988) but the action mechanism of both kinds of compounds on influx and efflux both singly and/or in interaction remains unknown. The involvement of shoot in this regulation has

been tested by leaf excision (Jarvis and MacDuff, 1989; MacDuff et al., 1989; MacDuff et al., 1992; Abdellaoui et al., 2001). They have found that uptake decreases in defoliated plant (MacDuff et al., 1992), while efflux decreases in excised root and decapitated plant and increases in defoliated plant compared to intact plant (Abdellaoui et al., 2001), leading these authors to the suggestion that shoot may regulate uptake by stimulation and reduction of efflux by apex and leaves, respectively. However, very little is known about these events and neither the extent of shoot contribution nor the mechanism of this control and the nature of the biological shoot signal(s) by which root efflux is modulated are understood. The aim of the present paper was to analyse the effect of KCl-salt, genotype, light and darkness on the E regulation by the aboveground parts in wheat.

## Materials and methods

### Plant material and growing conditions

Wheat seeds (*Triticum aestivum* L., var. Achtar, Saâda, Saba and Tegye32) disinfected for 5 min in sodium hypochlorite (37 g/l) were soaked for 8 h in distilled water and then allowed to germinate for 6 days on moist cheesecloth in darkness at 18 to 20°C. Seedlings were planted in groups of 25 in plastic holders and placed in 5 litres  $\text{NO}_3^-$  solution. The  $\text{NO}_3^-$  solution at pH 5.5 contained 3 mM  $\text{KNO}_3$ , 2.5 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.75 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 mM  $\text{NaCl}$ , 0.75 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 6  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 48.5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 16.5  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  and 0.5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . Iron was added as 10 mg of  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA per litre of  $\text{NO}_3^-$  solution. Solutions were constantly aerated and changed every three days. Growth was carried out in controlled chamber where light was applied during a 16 h photoperiod by white fluorescent bulbs (mixolamp 160W) and tubes (40W) to give 2000 lux at pot level. Temperature was maintained at 21°C in light period and 18°C in dark period. Relative humidity was about 65%.

### Plant treatments

On the 21<sup>st</sup> day after soaking, counted from the base the first (L1) and the second (L2) leaves had reached full expansion whereas the third (L3) was young still expanding leaves in all varieties. The fourth leaf (L4) begins to appear. Three hours after the start of the light period, four experimental treatments were performed: (1) intact seedlings, (2) excised roots: seedlings were defoliated at the shoot/root junction, (3) defoliated seedlings: defoliation removed all lamina tissue of leaves 1, 2 and 3 but the fourth leaf and apex were not touched, and (4) decapitated seedlings: the fourth leaf and apex were removed and the leaves 1, 2 and 3 were not touched. Four intact, excised, decapitated or defoliated plantlet roots of each variety were rinsed three times with distilled water and placed in light or dark in a test tube containing 40 ml of distilled water or 40 ml of salt solution, at pH 5.5, similar to the complete nutrient solution except that  $\text{NO}_3^-$  salts were replaced by 3 mM  $\text{KCl}$  and 2.5 mM  $\text{CaSO}_4$ . The solutions were constantly aerated. At the end of the first hour, the roots were placed in another 40 ml of the identical solution for 1 h. The sequence was continued through 2-8 h and the medium was changed every two hours. At the end of the experimental period (8 h), all plant roots were removed from the bathing solution; roots and shoots of the seedlings were excised, dried and weighed.  $\text{NO}_3^-$ -N leaked out from the roots to the solutions at different times were concentrated separately in 2 ml of distilled water and determined according to the method of Cataldo et al. (1975). For each of the four varieties four repetitions (each of four plants) were

realized for each experimental treatment. For each repetition five determinations were made during the time with the same plants. In the figures, nitrate E is given as  $\mu\text{g NO}_3^- \text{-N E}$  per root dry weight. The data were analysed by ANOVA (analysis of variance,  $P < 0.05$ ) to prove the significant difference between varieties and between treatments. Standard errors were calculated for all means and where no error bars appear, the standard error falls within the size of the symbol.

## Results and discussion

Efflux most likely is a channel-mediated process (Glass and Siddiqi, 1995) and generally increases with increasing internal  $\text{NO}_3^-$  concentration (Zhang and MacKown, 1993). It is also found to be highly related to relative growth rate and  $\text{NO}_3^-$  translocation (MacDuff et al., 1994; Ter Steege, 1996; Ter Steege et al., 1999; Scheurwater et al., 1999). However, experimental information on E regulation in higher plant roots is still lacking, and other internal and external regulating factors might be involved as well (Aslam et al., 1995, 1996; BenDriss Amraoui et al., 2000, BenDriss Amraoui and Talouizte, 2001).

Differences between salt and water and between varieties are found when we compare the E from ER and DFS to that of IS. Similarly, differences were also found between varieties in E from DCS compared to IS. ER, compared to IS, affects E in both solutions for all varieties, except in Tegye32 (Fig. 1). In Achtar, ER slightly increases E in salt and not in water compared to IS. In Tegye32, it does not affect significantly E in both solutions. In Saâda and Saba, ER decreases highly E in salt (73.43% of IS in Saâda and 66% in Saba), whereas in water, it only slightly decreases (33.17% in Saâda and 8.1% in Saba, Fig. 1).

The effect of shoot on E is different from variety to another since the effect of ER vary with variety (E decreases or not). This effect is dependent on ions in the root zone. Moreover, the fact that root excision slightly affects E in Achtar and Tegye32 in all solutions suggests that E in these varieties, in contrast to the others, is slightly dependent on xylem and phloem loading and shoot. The rapid and considerable decline of E from Saâda and Saba in the first hour after defoliation (Fig. 1) is in accordance with data of Jarvis and MacDuff (1989). They showed that net  $\text{NO}_3^-$  uptake and assimilation by the roots of defoliated grass plants continue for 15 h after defoliation, before declining to low levels for several days. Similarly, de Visser et al. (1997) found rapid incorporation of currently absorbed N in growth zones on the first day after defoliation.

In similar way, MacDuff and Jackson (1992) have found that ryegrass plant defoliated to 1 cm above the shoot/root junction, like that in prolonged exposure to darkness, showed a smaller increase of E associated to remarkable a decrease of  $\text{NO}_3^-$  translocation and an increase of  $\text{NO}_3^-$  reduction during the first 15 min after excision.

In another study using 7-day-old maize seedlings, Barthes et al. (1995) observed a sap dilution caused by an increase of water uptake during 5 h after detopping. They have also found that root NR was relatively important at 5 h after detopping and was increased with increasing incubation time or external  $\text{NO}_3^-$  concentration. Similarly to defoliation, it has been

found that the absence of  $K^+$  ions reduced  $NO_3^-$  transport to shoots (Blevins et al., 1978; Rufty et al., 1981) and enhanced  $NO_3^-$  reduction in roots (Rufty et al., 1981). According to Miller and Smith (1996) xylem loading may be involved in the regulation of root cytosolic concentration of nitrate ( $[NO_3^-]_{\text{cyt}}$ ). Indeed, Ter Steege et al. (1999) found that differences in  $NO_3^-$  translocation between morning and afternoon coincided with differences in  $E$ , which is in accordance with the suggested regulation of  $NO_3^-$  efflux by  $[NO_3^-]_{\text{cyt}}$ .

In addition, enhanced  $NO_3^-$  efflux per net mole of  $NO_3^-$  taken up during the dark period is found to reflect diurnal variations in  $NO_3^-$  flux to the xylem (Scheurwater et al., 1999). A lower rate of  $NO_3^-$  flux to xylem was suggested to be associated with a lower rate of transpiration during the dark period. However, maintenance of a constant transpiration rate during the day/night cycle did not prevent the inhibition of net  $NO_3^-$  uptake in darkness, whereas it almost prevented the increase in root  $NO_3^-$  content in dark (Delhon et al., 1995b). This suggests that the  $NO_3^-$  efflux is not exclusively mediated by changes in the rate of  $NO_3^-$  transport to the xylem and transpiration, but is also modulated by changes in the rate of N assimilation as reported by Scheurwater et al. (1999).

The decline of  $E$  in ER of Saâda and Saba, in contrast to Achtar and Tegye32, might be related to an increased flux of  $NO_3^-$  to the reduction and assimilation pathway, leading to a lower  $[NO_3^-]_{\text{cyt}}$  and hence to a lower  $E$  (Teyker et al., 1988; Zhang and MacKown, 1993). However, the fact that  $E$  decreases considerably or increases slightly after suppression of shoot indicates that the aerial part stimulates  $E$ .

On the other hand, Champigny and Talouizte (1981) have found that L1, L2 and L3 accumulate 49.7, 21 and 16.6% of total  $^{14}C$  assimilated in their laminae and 2.6, 7.8 and 63% in their bases whereas they export 47.7, 71.2 and 20.4% (after 5 h in light), respectively. They also found that the ratio “% of  $^{14}C$  transported to the fourth leaf and apex/% of  $^{14}C$  transported to the root” was equal to 1 (16.5/15.7), 6.1 (51/8.3) and 11.2 (16.8/1.5) for L1, L2 and L3, respectively. This indicates that  $E$  may decrease by the suppression of leaf 4 and apex which compete with roots for solute export from L1, L2 and slightly from L3 (First hypothesis) and may increase by the suppression of solute export from leaves to roots (Second hypothesis).

To test the first hypothesis we followed  $E$  from decapitated seedlings during 8 h (Fig. 2). As compared to IS, a significant  $E$  reduction in DCS is also found only for Saâda and Saba. An increase is observed for Tegye32 but no increase is noted for Achtar. These  $E$  variations are in accordance with those from ER for all varieties (Figs. 1 and 2). This result shows that the observed reduction of  $E$  in ER is due essentially to the suppression of L4 and apex. This also indicates that the leaf 4 and apex affect more  $E$  in Saba than in Saâda.

However, the low increase of E in Achar and Tegye32 after decapitation is in line with the results obtained in ER, suggesting that leaf 4 and apex play little role in the regulation of E in these two varieties leading to the conclusion that E control also involves roots.

Recently, Siebrecht and Tischner (1999) found that  $\text{NO}_3^-$  concentration in xylem sap dropped immediately after transfer of decapitated plants to N-free medium, indicating the close connection between  $\text{NO}_3^-$  uptake and xylem loading. They, however, also found that even after 24 h of  $\text{NO}_3^-$  depletion there is still a low  $\text{NO}_3^-$  concentration found in the xylem sap, indicating a very slowly occurring unloading of the storage tissue which is never sufficient to maintain the  $\text{NO}_3^-$  concentration in the xylem sap (Siebrecht and Tischner, 1999). This implies that here the decline in  $\text{NO}_3^-$  efflux from ER and DCS of Saâda and Saba occurs even if  $\text{NO}_3^-$  concentration in xylem sap dropped certainly after  $\text{NO}_3^-$  removal from the bath solution. This observation indicates an increase of nitrate reduction in Saâda and Saba after leaf cutting as found by MacDuff and Jackson (1992). The fact that E decreases in ER and DCS of Saâda and Saba may also mean that in these two varieties leaf 4 and apex compete probably more for solute export with roots than in Achar and Tegye32.

To test the second hypothesis, E is followed from defoliated seedlings in which all leaves are removed, except leaf 4 and apex (Fig. 3). In water-light, DFS does not affect E for Tegye32, whereas it increases significantly for Saâda and Saba, and decreases significantly for Achar compared to IS. In salt-light, DFS increases significantly E in Saâda, but does not increase that in Achar, Saba and Tegye32. However, the fact that DFS in Saba does not increase more E than IS in salt-light as in water-light is due to the salt effect on the root membrane stability which increases E of both DFS and IS and thus masks the effect of leave removal on E in Saba. Similarly, the increasing effect of leaves cutting on E in Saâda is considerably reduced in salt compared to that obtained in water (Fig. 3). These Saâda and Saba behaviours in salt indicate that salt may also affect directly or indirectly the efflux regulation by shoot.

DFS of Achar and Tegye32 does not leak out in water-light more  $\text{NO}_3^-$  than those of Saâda and Saba compared to IS (Fig. 3). These observations which confirm our second hypothesis show that if the effect of leaf 4 and apex is low or high it is also low or high by leaves, respectively, and if defoliation increases E in water, it also increases significantly E in salt, respectively. For example, in Saâda and Saba E is increased in DFS and decreased in DCS, whereas in Achar and Tegye32 E is slightly affected in the two cutting treatments. This is in line with ER data and indicates the existence of genotypic differences in the relative size of shoot control of E (low shoot control of E in Achar and Tegye32 and high in Saâda



and Saba). This also indicates much more dependence of E on root than on shoot in Achtar and Tegye32 in contrast to Saâda and Saba.

Indeed, this varietal difference in the partitioning of E control between shoot and roots is likely related to differences in the partitioning of  $\text{NO}_3^-$  reduction between leaves and roots since  $\text{NO}_3^-$  uptake and efflux are found to increase and decrease, respectively, by shoot  $\text{NO}_3^-$  reduction products (organic acids, Ben-Zioni et al., 1971; Touraine et al., 1994; Abdellaoui, 2001; Larhnm, 2001). Since E is found to vary slightly in DFS and DCS of Achtar and Tegye32,  $\text{NO}_3^-$  reduction is probably lower in shoot than in roots, whereas for Saâda and Saba, in which E is found to highly increase (in DFS) and decrease (in DCS)  $\text{NO}_3^-$  reduction is probably similar or higher in shoot than in roots.

The fact that E decreases in excised roots and decapitated seedlings while it increases in defoliated seedlings (in Saâda and Saba) suggests that the leaf 4 and apex stimulate E by chemical factor descended from the top and leaves inhibit it by solute export. Additionally, the fact that in ER the E decreases considerably, instead of to remain constant or to increase (in Saâda and Saba), even if solute export from the shoot is entirely abolished shows that the effect of leaf 4 and apex is more important than that of the other leaves or that root reserves in ER have masked the decline effect of export from leaves to roots. This later observation may be discarded because when the leaves are removed alone (as in DFS) the root reserves do not prevent an increase of E. Similarly, the E does not decrease significantly even if glucose (at 40 mM) is added to ER in the bath solution (Abdellaoui, 2001; Larhnm, 2001). These observations indicate that shoot control of E is occurred by other translocated compounds more than by sugar export from shoot. Nevertheless, questions about the origin of E variations after decapitation and defoliation remain to be answered. Are variations due to the removal parts and/or to the residual parts after cutting? What is the real effect of leaf 4 and apex, and leaves 1, 2 and 3 both singly and/or in interaction in plant control of E?

It has been reported that the modification of the height by defoliation or modification of the activity of leave sources produces a modification of distribution of assimilate flux patterns and an effect in turn on the remained sources leading to changes in source-sink relations and competitions (Prioul, 1984). In *Lolium*, excision of lower leaves increases assimilate translocation from the upper leaves to the roots (Evans and Wardlaw, 1964). However, an important defoliation tends to favour globally supplying of meristems at the root expense (Ryle and Powell, 1975). These compensatory changes of fluxes of currently assimilated carbon and nitrogen between the residual parts of defoliated plants at short-term may mask in part the real contribution of the removed part of shoots on E since plant tends to

adapt to the new situation after defoliation. But, even if this adaptation is specific to the removed parts the variation may also result in the contributions of the residual parts.

In salt-dark, DFS increases slightly E in Achtar, but decreases significantly in Saâda, Saba and Tegye32 compared to IS (Fig. 4). This observation indicates that in dark when leaves are removed the E does not increase as in light, but decreases due likely to the diminution of the activities of residual part (L4 and apex) and/or to the decline of solute translocation to roots in dark. This shows that leaves are needed in dark to sustain the E stimulating activity of leaf 4 and apex (biosynthesis of compound). This also indicates that the residual parts in defoliated seedlings play an important role in the control of efflux and suggests that in DCS the decrease of E in Saâda and Saba (Fig. 2) is not only due to the elimination of leaf 4 and apex but is also due likely to the contribution of the residual parts (leaves 1, 2 and 3) as reported by Abdellaoui et al. (2001), who have found that leaves 1, 2 and 3 are responsible for the decline of E in DCS in light compared to DCS in dark.

However, this high decline in DFS-dark as in ER and DCS (for Saâda and Saba), in contrast to that in DFS in light (Figs. 1, 2 and 5), indicates that nitrate reduction of defoliated seedlings is not decreased in dark. This contrasts with the known effect of induced-dark inactivation of NR, but is in accordance with the hypothesis of MacDuff and Jackson (1992) according to which  $\text{NO}_3^-$  reduction balances the decline of  $\text{NO}_3^-$  translocation and prevent the increase of  $[\text{NO}_3^-]_{\text{cyt}}$  and E after cutting. Taken together, these observations suggest that shoots affect efflux and root nitrate reduction since defoliation prevents an increase of E and probably a decline of nitrate reduction in dark.

In water-dark, DFS decreases E in Saâda and Tegye32 but increases in Achtar and Saba compared to IS (Fig. 4). This effect is significant in Saâda and Saba and not in Achtar and Tegye32 and confirms the low shoot control of E for Achtar and Tegye32. The fact that for Saba in DFS-dark, compared to IS, E increases in water and decreases in salt is not understood (Fig. 3). These data are in line with those in salt-dark, except for Saba, and indicate that L4 and apex utilize their photoassimilats in light or their reserves transported from leaves 1, 2 and 3 to the apex to stimulate E in dark. This hypothesis is in accordance with the synthesis of factors like (i) auxin (AIA) in leaf 4 and apex (from the amino acid Tryptophane, Eckardt, 2001) and (ii) organic acids in leaves 1, 2 and 3 (from biochemical pH-stat in leaves, Ben-Zioni et al., 1971) as suggested by Abdellaoui (2001) and Larhnm (2001), who have found that indol butyric acid (AIB) and organic acids (succinate and malate) applied directly to roots stimulates and reduce E, respectively.

To attest this hypothesis and to verify whether leaves 1, 2 and 3 contribute in the L4 and apex control of E in dark, similar experimental treatment is performed as described for DFS treatment in Material and methods section, except that only L1 and L2 are removed (-L1,2). In salt-light, -L1,2 increases E dramatically in Saâda and less intensively in Tegye32, whereas it does not affect for Saba and decreases for Achtar compared to IS (Fig. 5). In salt-dark, -L1,2 decreases considerably E in Saâda and Saba, while it slightly increases for Achtar and Tegye32. Interestingly, this result confirms the E increase in light for Saâda and decline in dark for Saâda and Saba observed in salt-DFS (Figs. 3, 4 and 5), leading to the suggestion that leaves 1 and 2 sole can totally sustain leaf 4 and apex in their efflux stimulating activity. However, this behaviour of Saâda and Saba contrasts with that of wheat varieties reported by Abdellaoui et al. (2001) and Larhnm (2001), who have found that in salt-DFS dark increases more E compared to light as exactly found here for Tegye32 and slightly for Achtar. According to theses authors, this was due low AIA oxidation in dark.

The present data show that the genotype, in which E is reduced in salt, shows little if any response of E to defoliation (Achtar and Tegye32), whereas the genotype, in which E is not reduced significantly (Saâda) or is increased (Saba) in salt, shows high effect of defoliation on E. Since ion leakage is ascribed to be affected by salts (Navari-Izzo et al., 1988), and by plant perturbations caused by defoliation (Ter Steege and Stulen, 1997; Ter Steege et al., 1998), these observations indicate close links between defoliation and salt effects. This also suggests that salt effects on E are closely related to the aerial part and ion circulation within the plant.

When we compare DFS in dark to ER, we found that in salt as well as in water E is similar in both defoliation treatments for Achtar, but is significantly higher in DFS than in ER for Saba and Tegye32 in both mediums. For Saâda, E is significantly higher in DFS than in ER only in salt (Fig. 6). These data show that E from DFS is only 2 times larger than from ER for Saâda (salt), Saba and Tegye32 (salt and water). This contrasts with data of Abdellaoui et al. (2001), who have found a high increase (8 to 10 times) of E in DFS compared to ER in all their varieties. This discrepancy is certainly an effect of genotype since here Achtar shows no difference between the two defoliation treatments.

However, if we compare DCS to DFS in dark or light, we found that E increases progressively from DCS in light to DFS in dark and from DFS in dark to DFS in light for Saâda and Saba, whereas for Achtar and Tegye32, the E is relatively similar for all these treatments, except for DFS of Achtar in dark (Figs. 2, 3 and 4). The E increases from DCS to DFS in light probably with increasing of AIA and/or Asn and Gln transported from leaf 4 and

apex to roots and/or with decreasing of organic acids from the residual part as suggested by Casadesus et al. (1995), who have reported that light stimulates uptake by intermediate agent descended from shoot.

Exogenous supply of amino acids or malate, a  $\text{NO}_3^-$  assimilation by-product (Ben-Zioni et al., 1971; Touraine et al., 1988), depress and stimulates  $\text{NO}_3^-$  uptake, respectively (Lee et al., 1992; Muller and Touraine, 1992; Touraine et al., 1992). However, uptake was found to be released essentially on  $\text{NO}_3^-$  influx whereas it appeared to decrease slightly E by decreasing influx and root  $[\text{NO}_3^-]_{\text{cyt}}$  (Muller et al., 1995). This observation suggests that here (where  $\text{NO}_3^-$  influx is nil) if amino acids contribute to E variation it may occur only via its effect on NR, whereas for organic acids it may occur via NR and/or efflux (Abdellaoui, 2001) as suggested for  $\text{NO}_3^-$  uptake (Touraine et al., 1988; Muller and Touraine, 1992).

Recently, Schnyder and de Visser (1999) found that carbon of amino acids constituted approximately 60% of the net influx of reserve carbon in shoot regrowth after defoliation. Similarly, de Visser et al. (1997) found higher carbon amino acids turnover in root growth zones than in leaf growth zones after defoliation. If these occur here during 8 h after defoliation they may explain the high decline of E in ER and DCS by decreased amount of amino acids and hence increased amount of organic acids which may operate at least in part on NR activation (Müller et al., 2001) and/or directly on E. But, the fact that E does not decrease also in DFS-light, while it declines only in DFS-dark suggests that this amino acid turnover in root is likely modulated by leaf 4 and apex in light.

MacDuff et al. (1989) have found that defoliation increases the vacuolar storage demand in roots of grasses. Moreover, they have found that defoliation decreases uptake in high N-seedlings and not in low N-seedlings compared to control, indicating that the effect of defoliation on  $\text{NO}_3^-$  fluxes may be affected by N-status. However, the fact that E in Achtar and Tegye32 is slightly affected by leaves and apex removals, like for  $\text{NO}_3^-$  uptake in low N-seedlings of MacDuff et al. (1989), suggests that in these two varieties N-status is probably lower than in the others. Plant N-status is relatively high in all these varieties. Achtar, Saâda and Tegye32 show similar N-status, whereas Saba shows low N-status and organic soluble N (**chapter 2**, Tab. 6). Nitrate concentration of roots is relatively similar for all the four varieties, but in shoot only slight differences in  $[\text{NO}_3^-]$  are found between all varieties (**chapters 3** [Tab. 2] and **4** [Fig. 3]). This N data do not reflect the behaviour of all varieties in E and suggests that other factors are involved in E regulation.

It has been reported by many workers that phytohormones are not directly involved in the adjustment of  $\text{NO}_3^-$  transport system to plant N demand (Chapin et al., 1988; Radin and

Matthews, 1989; Chapin et al., 1990; Clarkson and Touraine, 1994). Similarly, Chapin et al. (1988) have found that exogenous ABA does not stimulate root  $\text{NO}_3^-$  uptake. In addition, it has also pointed out that amino acids seem affect E only indirectly via their effect on influx (Muller et al., 1995) or by their accumulation in root (Muller and Touraine, 1992), suggesting that the E variation observed here may be probably indirectly due to the effect of these both kind of compounds on NR (decline in NR mRNA by an increase of abscisic acid/cytokinin ratio [ABA/CK, Lu et al., 1992] and/or by an increase of Asn and Gln in roots [Sivasankar et al., 1997]).

In similar way, the fact that AIA induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation and thus an increase in protein kinase activity in roots of *Arabidopsis* seedlings (Mockaitis and Howell, 2000), which may phosphorylate NR and thereby make it a target for inhibition by 14-3-3 protein binding (MacKintosh et al., 1995; Kaiser et al., 1999; Sugden et al., 1999), suggests that the reported effects of apex or AIB application to root by Abdellaoui (2001) and Larhnm (2001) or the observed effect of L4 and apex here on E may occur probably via its effect on  $\text{NO}_3^-$  reduction rather than directly on  $\text{NO}_3^-$  efflux. The fact that NR mRNA increases 15 min after application of CK to plant in dark is in favour of this suggestion (Faure et al., 1997).

Zhang and Forde (2000) found that a critical stage in the development of the lateral root is highly susceptible to inhibition by a systemic signal that is related to the amount of absorbed nitrate by the plant. They have provided evidence for an overlap between the auxin and response pathways in the control of lateral root elongation. The systemic inhibitory effect, which delays the activation of the lateral root meristem, appears to be positively correlated with the N status of the plant and is postulated to involve a phloem-mediated signal from the shoot.

In their assay with nodes from wild-type and hormone-signalling mutants to test the role of ethylene (ET), CK and ABA in bud inhibition by apical AIA, Chatfield et al. (2000) found that ET and ABA signalling are not to be required for AIA action. By contrast, basally applied CK was found to release lateral buds from inhibition by apical AIA, while apically applied CK dramatically increased the duration of inhibition. This observation, which may not eliminate CK as a second messenger for AIA-mediated bud inhibition, indicates that if auxines play an important role here in the E control by the leaf 4 and apex its effect may be probably modulated, aided and/or exercised by a second messenger as found for AIA-mediated bud inhibition. This also suggests that if the hormone is basally applied it might

produce different effects, on root nitrate metabolism, from that if it is apically applied or synthesized.

In addition to this, Rubery et al. (1987) and Lomax et al. (1995) proposed that AIA is co-transported with one or two protons by the influx carrier and excreted as an anion by the efflux carrier, leading to the suggestion that applied AIA to root might induce internal acidification since exogenous AIA induced an activation of ATPase and proton-pumping activities of isolated and purified plasma membrane and hence a proton efflux (Santoni et al., 1990, 1991; Masson et al., 1996). Furthermore, increased  $H^+$  efflux requires the presence of  $K^+$  (Claussen et al., 1997), presumably because an influx of  $K^+$  is required as a charge balance for the electrogenic proton efflux. Consistent with the acid growth theory, in the absence of  $K^+$  and detectable proton efflux, no auxin-induced growth occurs (Claussen et al., 1997). Delbarre et al. (1998) found that the activity of the influx AIA carrier decreased on increasing external pH and on decreasing internal pH, whereas that of the efflux carrier is only impaired on internal acidification. These observations show that  $K^+$  influx by acting on internal acidification favours auxin-induced growth, protein synthesis (Walker et al., 1998) and AIA fluxes.

The implication of an anion channel in the control of cytosolic  $H^+$  concentration has also been found (Johannes et al., 1998). Similarly, Beffagna et al. (1995) have found that ABA induces changes in  $Cl^-$  fluxes and  $pH_{cyt}$  in *Elodea densa* leaves. However, the fact that basally applied AIB favours efflux of nearly all endogenous root nitrate during 8 h and that this effect is very rapid (observed already after 1 h) and increase gradually and intensively with time (Abdellaoui, 2001) suggests that the  $NO_3^-$  channels themselves are highly activated by the internal acidification caused by AIB as caused probably for  $Cl^-$  by ABA.

An increase of water flux and sap dilution were observed after detopping (Barthes et al., 1995), due to the removal of the resistance of the vascular system of leaves. These authors showed clearly that supply of KCl enhanced this rate compared to water. This suggests that here E may have been decreased in ER and DCS by an increase of water uptake reinforced by KCl present in salt solution compared to water (Saâda and Saba, Fig. 1), whereas in DFS-light E increases because water uptake may be not probably increased by defoliation in contrast to E in DFS-dark (Fig. 4).

The fact that there was little changes in the E between ER and IS for Achta and Tegye32 (Fig. 1) suggests that the resistance to nitrate movement in these two genotypes, which likely contain some “P-protein” (Giaquinta and Geiger, 1973), is comparatively low. In another study, uptake experiments with N-starved seedlings confirm the behaviour of our

genotypes and show that 2 to 3 fold enhancement of  $\text{NO}_3^-$  uptake is induced by detopping Saâda and Saba seedlings compared to IS, whereas for Achtar and Tegye32, no differences between detopped and IS are obtained (data not shown). The removal of shoot has thus little impact on the uptake and efflux of  $\text{NO}_3^-$  in Achtar and Tegye32.

On the other hand, it was suggested that  $\text{NO}_3^-$  uptake was regulated in accordance with plant osmotic adjustments (Steingröver et al., 1986). Reduced  $\text{NO}_3^-$  uptake rate is observed in plants whose water content declined as a result of humidity (Brewitz et al., 1996). Similarly, it was shown that changes in plant water content damp variations of  $\text{NO}_3^-$  uptake rate and plant  $\text{NO}_3^-$  concentration in the normal 24 h day cycle, and sustain uptake even when  $\text{NO}_3^-$  assimilation and growth have ceased in prolonged darkness, leading to the conclusion that uptake may be only driven by plant water accumulation and may be not only under control of N metabolism (Cárdenas-Navarro et al., 1998).

Moreover, as concentration ( $\text{mol m}^{-3}$ ) is the ratio between nitrate content ( $\text{mol g}^{-1}$  dry wt.) and water content ( $\text{m}^3 \text{g}^{-1}$  dry wt.), if an increase of endogenous water resulting from the imbalance between its uptake and transpiration occurs, it may lead to a decline of internal  $\text{NO}_3^-$  concentration and hence to decline of E since efflux is a channel-mediated process (Glass and Siddiqi, 1995) and generally decreases with decreasing internal  $\text{NO}_3^-$  concentration (Zhang and MacKown, 1993). This observation suggests that plant water might also modulate E.

For the above-mentioned reasons (later three paragraphs), the decrease of E in ER and DCS (Figs. 1 and 2) may be due to decrease of root  $[\text{NO}_3^-]_{\text{cyt}}$ , whereas the increase of E in DFS-light to an increase of root  $[\text{NO}_3^-]_{\text{cyt}}$  by an increase and decrease of internal water content (IWC), respectively. The decrease of E in DFS-dark may also be due to an increase of IWC. However, as suggested above for the auxin effects on E via anion protein channel and  $\text{H}^+$ -ATPase in the control of  $\text{pH}_{\text{cyt}}$ , auxin may also be involved in the changes of IWC and water uptake.

Indeed, since (i) nitrate supply that affects xylem/apoplastic pH (Clarkson and Touraine, 1994) and hence apoplastic ABA concentration (Wilkinson and Davies, 1997) can also affect transpiration, and (ii) an increase of ABA/CK ratio, which decreases NR mRNA (Lu et al., 1992), is correlated with a decline of transpiration and root hydraulic conductivity (Radin and Matthews, 1989, Radin, 1990) one cannot exclude the fact that AIA may be linked with plant water content and  $[\text{NO}_3^-]_{\text{cyt}}$  and modulate in part water specific channel and  $\text{NO}_3^-$  efflux carrier in cell root. However, the facts that (i) AIB stimulates efflux (Abdellaoui, 2001), (ii) plant water content affects  $[\text{NO}_3^-]_{\text{cyt}}$  and hence uptake and efflux (Zhang and

MacKown, 1993; Cárdenas-Navarro et al., 1998), and that (iii) AIA influx and efflux may stimulate anion protein channel and  $H^+$ -ATPase probably by increasing  $[H^+]_{\text{cyt}}$ , (Rubery, 1987; Lomax et al., 1995) suggest that AIA by decreasing plasmalemma aquaporin activity decrease IWC and hence increases  $[NO_3^-]_{\text{cyt}}$  and efflux of  $NO_3^-$ .

Furthermore, the facts that (1) aquaporin activity is regulated, in response to the apoplastic water potential, by phosphorylation/dephosphorylation processes (Maurel et al., 1995; Johansson et al., 1998) as NR activity to  $NO_3^-$  and light (MacKintosh, 1997), (2) aquaporin and NR activities are more linked to respiration metabolism (Kamaluddin and Zwiazk, 2001; Bloom et al., 1991), (3) water and  $NO_3^-$  fluxes are mediated by  $Ca^{2+}$  and  $NO_3^-$  (Gollan et al., 1992; Aslam et al., 1995; Barthes et al., 1995; 1996), (4)  $NO_3^-$  enhances the root hydraulic conductivity to water (Barthes et al., 1995), (5) water content regulates the internal  $NO_3^-$  concentration of plant (Cárdenas-Navarro et al., 1998; 1999), (6) effluxed  $NO_3^-$  can slip through the water channels as found for small organic solutes (i.e. alcohols, Hertel and Steudle, 1997), (7) the aquaporins largely account for the hydraulic conductivity of the root (Tazawa et al., 1996), and that (8) an increase of ABA/CK ratio, which decreases NR mRNA (Lu et al., 1992), is correlated with a decline of transpiration and root hydraulic conductivity (Radin and Matthews, 1989; Quintero et al., 1998, 1999), suggest that most likely efflux of  $NO_3^-$  is linked to water flux.

Finally, the present data show that the shoot control of E is highly dependent on genotype, salts and light. They indicate that root may also regulate E and that the older leaves 1 and 2 stimulate the apex effects on E. However, many questions remain to be answered. How plant roots perceive shoot signals involved in the regulation of efflux and  $[NO_3^-]_{\text{cyt}}$ , whether shoot induces a systemic signal that may be related to absorbed  $NO_3^-$  and whether leaves sustain apex AIA synthesis in dark are not yet known and offer an interesting topic for future research and a better understanding of the mechanisms of AIA biosynthesis (Eckardt, 2001).



### References

- Abdellaoui, A. 2001. Absorption et assimilation de l'azote chez le blé (*Triticum aestivum* L.): mise en évidence d'une régulation de l'efflux des ions  $\text{NO}_3^-$  racinaires par la partie aérienne. Thèse d'Etat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, FES.
- Abdellaoui, A., Talouizte, A. 2001. Effect of previous nitrogen starvation on  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  uptake and assimilation associated with the endogenous soluble carbohydrate utilization in Moroccan wheat seedlings. J. Plant Nutr. (in press).
- Abdellaoui, A., Larhnm, A., Talouizte, A. 1999. Accumulation, absorption et assimilation des nitrates chez différentes variétés de Blé tendre marocain: influence de la lumière. Can. J. Bot. 77, 1485-1489.
- Abdellaoui, A., Larhnm, A., Talouizte, A. 2001. Mise en évidence d'une régulation de l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  racinaire par la partie aérienne chez quatre cultivars de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Sais, Jouda, Marchouch et Khair: influence de la lumière. Can. J. Bot. 79, 398-403.
- Aslam, M., Travis, R. L., Huffaker, R. C. 1995. Effect of pH and calcium on short-term  $\text{NO}_3^-$  flux in root of barley seedling. Plant Physiol. 108, 727-734.
- Aslam, M., Travis, R. L., Rains, D. W., Huffaker, R. C. 1996. Effect of root perturbation and excision on nitrate influx and efflux in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedling. Physiol. Plant. 97, 425-432.
- Barthes, L., Bousser, A., Hoarau, J., Deléens, E. 1995. Reassessment of the relationship between nitrogen supply and xylem exudation in detopped maize seedlings. Plant Physiol. Biochem. 33, 173-183.
- Barthes, L., Deléens, E., Bousser, A., Hoarau, J., Prioul, J.-L. 1996. Nitrate use and xylem exudation in detopped wheat seedlings: an early diagnosis for predicting varietal differences in nitrogen utilisation? Aust. J. Plant Physiol. 23, 33-44.
- Beffagna, N., Romani, G., Gatti, L. 1995. Changes in chloride fluxes and cytosolic pH induced by abscisic acid in *Elodea densa* leaves. Bot. Acta 108, 74-79.
- BenDriss Amraoui, M., Talouizte, A. 2001.  $\text{NO}_3^-$  affects carbohydrate losses from wheat root. Acta Agronomica Hungarica, 49, 43-52.
- BenDriss Amraoui, M., Malali, A., Talouizte, A. 2000. Salts in the root zone affect  $\text{NO}_3^-$ -N losses from wheat root in light: influence of genotype and darkness. Cereal Research Communications 28, 379-386 .
- Ben-Zioni, A., Vaadia, Y., Lips, S. M. 1971. Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate

- reduction products in the shoot. *Physiol. Plant.* 24, 288-290.
- Blatt, M. R., Beilby, M. J., Tester, M. 1990. Voltage dependence of the *Chara* proton pump revealed by current-voltage measurement during rapid metabolic blockade with cyanide. *J. Membr. Biol.* 114, 205-224.
- Blevins, D. G., Hiatt, A. J., Lowe, R. H., Leggett, J. E. 1978. Influence of  $K^+$  on the uptake, translocation, and reduction of nitrate by barley seedlings. *Agron. J.* 70, 393-396.
- Bloom, J., Sukrapanna, S. S., Warner, R. L. 1991. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiol.* 99, 1294-1301.
- Brewitz, E., Larsson, C.-M., Larsson, M. 1996. Responses of nitrate assimilation and N translocation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to reduced ambient air humidity. *J. Exp. Bot.* 47, 855-861.
- Cataldo, D. A., Haroon, M., Schrader, L. E., Youngs, V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6, 71-80.
- Cárdenas-Navarro, R., Adamowicz, S., Robin, P. 1998. Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants: test of a feed back-based model. *J. Exp. Bot.* 49, 721-730.
- Cárdenas-Navarro, R., Adamowicz, S., Robin, P. 1999. Nitrate accumulation in plants: a role for water. *J. Exp. Bot.* 50, 613-624.
- Casadesus, J., Tapia, L., Lambers, H. 1995. Regulation of  $K^+$  and  $NO_3^-$  fluxes in roots of sunflower (*Helianthus annuus*) after changes in light intensity. *Physiol. Plant.* 93, 279-285.
- Champigny, M. L., Talouizte, A. 1981. Photosynthates distribution and metabolic fate in relation to nitrogen metabolism in wheat seedlings. In: Akoyunoglou, G., (Ed.), *Photosynthesis IV. Regulation of carbon metabolism*. Balaban International Science Services, Philadelphia, pp. 645-652.
- Chapin, III F. S. 1990. Effects of nutrient deficiency on plant growth: evidence for a centralized stress-response system. In: Davies, W. J., Jeffcoat, B., (Eds), *Importance of root to shoot communication in the response to environmental stress*. Monograph 21, British Society for Plant Growth Regulation, Bristol, pp. 135-148.
- Chapin, III F. S., Clarkson, D.T., Lenton, J. R., Walter, C. H. S. 1988. Effect of nitrogen stress and abscisic acid on nitrate absorption and transport in barley and tomato. *Planta* 173, 340-351.
- Chatfield, S. P., Stirnberg, P., Forde, B. G., Leyser, O. 2000. The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24, 159-169.

- Clarkson, D. T. 1985. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 36, 77-115.
- Clarkson, D. T. 1986. Regulation of the absorption and release of nitrate by plant cells: a review of current ideas and methodology. In: Lambers, H., Neeteson, J., Stulen, I., (Eds), *Physiological, ecological and applied aspects of nitrogen metabolism in higher plants*. Nijhoff, M., Dordrecht, pp. 3-27.
- Claussen, M., Lüthen, H., Blatt, M., Böttger, M. 1997. Auxin-induced growth and its linkage to potassium channels. *Planta* 201, 227-234.
- Deane-Drummond, C. E. 1986. Nitrate uptake into *Pisum sativum* L. cv. Feltham First seedlings: a commonality with nitrate uptake into *Chara Corallina* and *Hordeum vulgare* through a substrate cycling model. *Plant Cell Environ.* 9, 41-48.
- Delbarre, A., Muller, P., Guern, J. 1998. Short-lived and phosphorylated proteins contribute to carrier-mediated efflux, but not to influx, of auxin in suspension-cultured Tobacco cells. *Plant Physiol.* 116, 833-844.
- Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., Passama, L. 1995a. Diurnal regulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake in soybean plants. I. Changes in  $\text{NO}_3^-$  influx, efflux, and N utilization in the plant during the day/night cycle. *J. Exp. Bot.* 46, 1585-1594.
- Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., Passama, L. 1995b. Diurnal regulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake in soybean plants. II. Relationship with accumulation of  $\text{NO}_3^-$  and asparagine in the roots. *J. Exp. Bot.* 46, 1595-1602.
- De Visser, R., Vianden, H., Schnyder, H. 1997. Kinetics and relative significance of remobilized and current C and N incorporation in leaf and root growth zones of *Lolium perenne* after defoliation: assessment by  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  steady-state labelling. *Plant Cell Environ.* 20, 37-46.
- Eckardt, N. A. 2001. New insights into auxin biosynthesis. *Plant Cell* 13, 1-3.
- Evans, L. T., Wardlaw, I. F. 1964. Inflorescence initiation in *Lolium temulentum* L. IV. Translocation of the floral stimulus in relation to that of assimilates. *Aust. J. biol. Sci.* 17, 1-9.
- Faure, J. D., Meyer, C., Caboche, M. 1997. Assimilation du nitrate: nitrate et nitrite réductases. In: Morot-Gaudry, J.-F., (Ed.), *Assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique, biochimique et moléculaire*. INRA, Paris, pp. 45-65.
- Gazzarrini, S., Lejay, L., Gojon, A., Ninnemann, O., Frommer, W. B. 1999. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulate, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 11, 937-947.

- Giaquinta, R. T., Geiger, D. R. 1973. Mechanism of inhibition of translocation by localized chilling. *Plant Physiol.* 51, 372-377.
- Glass, A. D. M., Siddiqi, M. Y. 1995. Nitrogen absorption by plant roots. In: Srivastava, H. S., Singh, R. P., (Eds), Nitrogen nutrition in higher plants. Associated Publishing Co., New Delhi, pp. 21-56.
- Glass, A. D. M., Thompson, R. G., Bordeleau, L. 1985. Regulation of  $\text{NO}_3^-$  influx in barley. Studies using  $^{13}\text{NO}_3^-$ . *Plant Physiol.* 77, 379-381.
- Gollan, T., Schurr, U., Schulze, E.-D. 1992. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in, and pH of, the xylem sap. *Plant Cell Environ.* 15, 551-559.
- Hertel, A., Steudle, E. 1997. The function of water channels in *Chara*. The temperature dependence of water and solute flows provides evidence for composite membrane transport and for a slippage of small organic solutes across water channels. *Planta* 202, 324-335.
- Huang, N.-C., Liu, K.-H., Lo, H.-J., Tsay, Y.-F. 1999. Cloning and characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* 11, 1381-1392.
- Huang, N.-C., Chiang, C.-S., Crawford, N. M., Tsay, Y.-F. 1996. CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis* and shows cell type-specific expression in roots. *Plant Cell* 8, 2183-2191.
- Imsande, J., Touraine, B. 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiol.* 105, 3-7.
- Jeannette, E., Rona, J. P., Bardat, F., Cornel, D., Sotta, B., Miginiac, E. 1999. Induction of RAB18 gene expression and activation of  $\text{K}^+$  outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J.* 18, 13-22.
- Jarvis, S. C., MacDuff, J. H. 1989. Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. I. Recovery of uptake and growth and their interactions. *J. Exp. Bot.* 40, 965-975.
- Johannes, E., Crofts, A., Sanders, D. 1998. Control of  $\text{Cl}^-$  efflux in *Chara corallina* by cytosolic pH, free  $\text{Ca}^{2+}$ , and phosphorylation indicates a role of plasma membrane anion channels in cytosolic pH regulation. *Plant Physiol.* 118, 173-181.
- Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V. K., Chrispeels, M. J., Larsson, C., Kjellbom, P. 1998. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 10, 451-460.

- Kaiser, W. M., Weiner, H., Huber, S. C. 1999. Nitrate reductase in higher plants: a case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. *Physiol. Plant.* 105, 385-390.
- Kamaluddin, M., Zwiazek, J. J. 2001. Metabolic inhibition of root water flow in red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) seedlings. *J. Exp. Bot.* 52, 739-745.
- Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., Kirk, G. J. D. 1999. Nitrate-Ammonium synergism in rice. A subcellular flux analysis. *Plant Physiol.* 119, 1041-1045.
- Lainé, P., Ourry, A., Boucaud, J. 1995. Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L.: effects of localized nitrate supply. *Planta* 196, 77-83.
- Larhnm, A. 2001. Etude de l'assimilation des nitrates chez différentes variétés de blé tendre marocain (*Triticum aestivum* L.): Influence de la déficience en azote. Thèse Nationale, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, FES.
- Lee, R. B. 1993. Control of net uptake of nutrients by regulation of influx in barley plants recovering from nutrient deficiency. *Ann. Bot.* 72, 223-230.
- Lee, R. B., Drew, M. C. 1989. Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. *J. Exp. Bot.* 40, 741-752.
- Lee, R. B., Purves, J. V., Ratcliffe, R. G., Saker, L. R. 1992. Nitrogen assimilation and the control of ammonium and nitrate absorption by maize roots. *J. Exp. Bot.* 43, 1385-1396.
- Lin, C.-M., Koh, S., Stacey, G., Yu, S.-M., Lin, T.-Y., Tsay, Y.-F. 2000. Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, OsNRT1, from rice. *Plant Physiol.* 122, 379-388.
- Liu, K.-H., Huang, C.-Y., Tsay Y.-F. 1999. CHL1 is dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* 11, 865-874.
- Lomax, T. L., Muday, G. K., Rubery, P. H. 1995. Auxin transport. In Davies, P. J., (Ed.), *Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology*, Ed. 2. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 509-530.
- Lu, J.-L., Ertl, J. R., Chen, C.-M. 1992. Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. *Plant Physiol.* 98, 1255-1260.
- MacDuff, J. H., Jackson, S. B. 1992. Influx and efflux of nitrate and ammonium in Italian ryegrass and white clover roots: Comparisons between effects of darkness and defoliation. *J. Exp. Bot.* 43, 525-535.
- MacDuff, J. H., Jarvis, S. C., Mosquera, A. 1989. Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. *J.*

- Exp. Bot. 40, 977-984.
- MacDuff, J. H., Jarvis, S. C., Cockburn, J. E. 1994. Acclimation of  $\text{NO}_3^-$  fluxes to low root temperature by *Brassica napus* in relation to  $\text{NO}_3^-$  supply. J. Exp. Bot. 45, 1045-1056.
- MacKintosh, C. 1997. Regulation of C/N metabolism by reversible protein phosphorylation. In: Foyer, C. H., Quick, W. P., (Eds), A molecular approach to primary metabolism in higher plants. London: Taylor and Francis, pp. 179-201.
- MacKintosh, C., Douglas, P., Lillo, C. 1995. Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. Plant Physiol. 107, 451-457.
- Masson, F., Szponarski, W., Rossignol, M. 1996. The heterogeneity of the plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase response to auxin. Plant Growth Reg. 18, 15-21.
- Maurel, C., Kado, R. T., Guern, J., Chrispeels, M. J. 1995. Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin alpha-TIP. EMBO J. 14, 3028-3035.
- Miller, A. J., Smit, S. J. 1996. Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. J. Exp. Bot. 47, 843-854.
- Mockaitis, K., Howell, S. H. 2000. Auxin induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation in roots of *Arabidopsis* seedlings. Plant J. 24, 785-796.
- Muldin, I., Ingemarsson, B. 1995. A cDNA from *Brassica Napus* L. encoding a putative nitrate transporter (GenBank U17987). Plant Physiol. 108, 1341-1343.
- Muller, B., Touraine, B. 1992. Inhibition of  $\text{NO}_3^-$  uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. J. Exp. Bot. 43, 617-623.
- Muller, B., Tillard, P., Touraine, B. 1995. Nitrate fluxes in soybean seedling roots and their response to amino acids: an approach using  $^{15}\text{N}$ . Plant Cell Environ. 18, 1267-1279.
- Müller, C., Scheible, W.-R., Stitt, M., Krapp, A. 2001. Influence of malate and 2-oxoglutarate on the NIA transcript level and nitrate reductase activity in tobacco leaves. Plant Cell Environ. 24, 191-203.
- Navari-Izzo, F., Izzo, R., Bottazzi, F., Ranieri, A. 1988. Effects of water stress and salinity on sterols in *Zea mays* roots. Phytochem. 27, 3109-3115.
- Prioul, J.-L. 1984. Transport des assimilats. Transport et distribution des assimilats chez le maïs: mécanismes, rôle des facteurs externes. In: Gallais, A., (Coord.), Physiologie du maïs. Communications au Colloque Physiologie du Maïs. Royan, INRA, Paris, pp. 303-319.
- Quintero, J. M., Fournier, J. M., Benlloch, M. 1999. Water transport in sunflower root systems: effects of ABA,  $\text{Ca}^{2+}$  status and  $\text{HgCl}_2$ . J. Exp. Bot. 50, 1607-1612.
- Quintero, J. M., Fournier, J. M., Ramos, J., Benlloch, M. 1998.  $\text{K}^+$  status and ABA affect

- both exudation rate and hydraulic conductivity in sunflower roots. *Physiol. Plant.* 102, 279-284.
- Radin, J. W. 1990. Responses of transpiration and hydraulic conductance to root temperature in nitrogen- and phosphorus-deficient cotton seedlings. *Plant Physiol.* 92, 855-857.
- Radin, J. W., Matthews, M. A. 1989. Water transport properties of cortical cells in roots of nitrogen and phosphorus-deficient cotton seedlings. *Plant Physiol.* 89, 264-268.
- Rodgers, C. O., Barneix, A. J. 1988. Cultivar differences in the rate of nitrate uptake by intact wheat plant as related to growth rate. *Physiol. Plant* 72, 121-126.
- Rubery, P. H. 1987. Auxin transport. In: Davies, P. J., (Ed.), *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Martinus Nijhoff, Boston, MA, pp. 341-362.
- Rufty, T. W., Jackson, W. A., Raper, C. D. 1981. Nitrate reduction in roots as affected by the presence of potassium and by flux of nitrate through the roots. *Plant Physiol.* 68, 605-609.
- Ryle, G. J. A., Powell, G. E. 1975. Defoliation and regrowth in the graminaceous plant: the role of current assimilate. *Ann. Bot.* 39, 297-311.
- Santoni, V., Vansuyt, G., Rossignol, M. 1990. Differential auxin sensitivity of proton translocation by plasma membrane  $H^+$ -ATPase from tobacco leaves. *Plant Sci.* 68, 33-38.
- Santoni, V., Vansuyt, G., Rossignol, M. 1991. The changing sensitivity of auxin of the plasma-membrane  $H^+$ -ATPase: relationship between plant development and ATPase content of membranes. *Planta* 185, 227-232.
- Scaife, A. 1989. A pump/leak/buffer model for plant nitrate uptake. *Plant Soil* 114, 139-141.
- Scheurwater, I., Clarkson, D. T., Purves, J. V., van Rijt, G., Saker, L. R., Welschen, R., Lambers, H. 1999. Relatively large nitrate efflux can account for the high specific respiratory costs for nitrate transport in slow-growing grass species. *Plant Soil* 215, 123-134.
- Schnyder, H., de Visser, R. 1999. Fluxes of reserve-derived and currently assimilated carbon and nitrogen in perennial ryegrass recovering from defoliation. The regrowing tiller and its component functionally distinct zones. *Plant Physiol.* 119, 1423-1435.
- Sechley, K. A., Yamaya, T., Oaks, A. 1992. Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. *Int. Rev. Cyt.* 134, 85-163.
- Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., Ruth, T. J., Rufty, T. W. 1990. Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of  $^{13}NO_3^-$  influx. *Plant Physiol.* 93, 1426-1432.
- Siebrecht, S., Tischner, R. 1999. Changes in the xylem exudate composition of poplar (*P. tremula* x *P. alba*)-dependent on the nitrogen and potassium supply. *J. Exp. Bot.* 50, 1797-1806.

- Sivasankar, S., Rothstein, S., Oaks, A. 1997. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. *Plant Physiol.* 114, 583-589.
- Smith, F. A., Reid, R. J. 1991. Biophysical and biochemical regulation of cytoplasmic pH in *Chara corallina* during acid loads. *J. Exp. Bot.* 42, 173-182.
- Steingröver, E., Ratering, P., Siesling, J. 1986. Daily changes in uptake, reduction and storage of nitrate in spinach grown at low light intensity. *Physiol. Plant.* 66, 550-556.
- Sugden, C., Donaghy, P. G., Halford, N. G., Hardie, D. G. 1999. Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant physiol.* 120, 257-274.
- Talouizte, A., Guiraud, G., Moyse, A., Marol, C., Champigny, M. L. 1984. Effect of previous nitrate deprivation on  $^{15}\text{N}$ -nitrate absorption and assimilation by wheat seedlings. *J. Plant Physiol.* 116, 113-122.
- Tazawa, M., Asai, K., Iwasaki, N. 1996. Characteristics of Hg- and Zn-sensitive water channels in the plasma membrane of *Chara* cells. *Bot. Acta* 109, 388-396.
- Ter Steege, M. W. 1996. Regulation of nitrate uptake in a whole plant perspective. Thesis. University of Groningen, The Netherlands.
- Ter Steege, M. W., Stulen, I. 1997. A theoretical model for explaining the effect of physical manipulation on nitrate uptake in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Russian J. Plant Physiol.* 44, 500-504.
- Ter Steege, M. W., Stulen, I., Wiersema, P. K., Posthumus, F., Vaalburg, W. 1999. Efficiency of nitrate uptake in spinach: impact of external nitrate concentration and relative growth rate on nitrate influx and efflux. *Plant Soil* 208, 125-134.
- Ter Steege, M. W., Stulen, I., Wiersema, P. K., Paans, A. J. M., Vaalburg, W., Kuiper, P. J. C., Clarkson, D. T. 1998. Growth requirement for N as a criterion to assess the effects of physical manipulation on nitrate uptake fluxes in spinach. *Physiol. Plant.* 103, 181-192.
- Teyker, R. H., Jackson, W. A., Volk, R. J., Moll, R. H. 1988. Exogenous  $^{15}\text{NO}_3^-$  influx and endogenous  $^{14}\text{NO}_3^-$  efflux by two maize (*Zea mays* L.) inbreds during nitrogen deprivation. *Plant Physiol.* 86, 778-781.
- Touraine, B., Gojon, A. 1997. Intégration de l'absorption du nitrate dans la plante. In: Morot-Gaudry, J.-F., (Ed.), *Assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique, biochimique et moléculaire*. INRA, Paris, pp. 109-128.
- Touraine, B., Clarkson, D. T., Muller, B. 1994. Regulation of nitrate uptake at the whole plant level. In: Roy, J., Garnier, E., (Eds), *A Whole plant perspective on carbon-nitrogen*



- interactions. SPB Academic Publishing, La Haye, pp. 11-30.
- Touraine, B., Grignon, N., Grignon, C. 1988. Charge balance in  $\text{NO}_3^-$ -fed soybean. Estimation of  $\text{K}^+$  and carboxylate recirculation. *Plant Physiol.* 88, 605-612.
- Touraine, B., Muller, B., Grignon, C. 1992. Effect of phloem-translocated malate on  $\text{NO}_3^-$  uptake by roots of intact soybean plants. *Plant Physiol.* 99, 1118-1123.
- Triplett, E. W., Barnett, N. M., Blevins, D. G. 1980. Organic acids and ion balance in xylem exudates of wheat during nitrate and sulfate absorption. *Plant Physiol.* 65, 610-613.
- Tsay, Y.-F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. A., Crawford, N. M. 1993. The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* 72, 705-713.
- Zhang, N., MacKown, C. T. 1993. Nitrate fluxes and nitrate reductase activity of suspension-culture tobacco cells. Effects of internal and external nitrate concentrations. *Plant Physiol.* 102, 851-857.
- Zhang, H., Forde, B. G. 2000. Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.* 51, 51-59.
- Walker, D. J., Colin, R. B., Miller, A. J. 1998. The role of cytosolic potassium and pH in the growth of barley roots. *Plant Physiol.* 118, 957-964.
- Walker, D. J., Leigh, R. A., Miller, A. J. 1996. Potassium homeostasis in vacuolated plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10510-10514.
- Wilkinson, S., Davies, W. J. 1997. Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplasm. *Plant Physiol.* 113, 559-573.

## **CHAPITRE 8**

**The mature leaves may be the site of AIA metabolite accumulation involved in the apex control of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> efflux in darkness: Influence of KCl-salt, and genotype**

Mohammed BenDriss Amraoui, Asmae Malali, and Ahmed Talouizte

Laboratory of plant physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar el Mehraz,  
P.O. Box 1796, Atlas, Fès, Morocco

Les résultats de ce chapitre sont présentés tels qu'ils ont été soumis pour publication dans  
Cereal Research Communications.

Corresponding author: BenDriss Amraoui Mohammed, Laboratoire de Physiologie végétale,  
Département de Biologie, Faculté des Sciences Dhar el Mehraz B.P. 1796, Atlas, Fès, Maroc.

Telephone & Fax: (212) 055-73-29-81

E-mail: msms\_60@hotmail.com

## Résumé

L'effet des feuilles matures sur le contrôle de l'efflux du  $\text{NO}_3^-$  (E) par l'apex a été étudiée dans trois conditions expérimentales: plantes intactes (PI), plantes défoliées (-F1) (PI moins la première feuille), plantes défoliées (-F1,2) (PI moins la première et la deuxième feuille). Les résultats obtenus montrent que chez Tegye<sup>32</sup> E à partir de (-F1) et (-F1,2) augmente sur eau et sur sel à la lumière et à l'obscurité, excepté (-F1) sur eau à l'obscurité. Chez Achtar, l'efflux à partir de (-F1) et (-F1,2) augmente seulement sur sel à l'obscurité comparé à PI sur sel à la lumière. Chez Saba, E à partir de (-F1) à l'obscurité augmente seulement avant 4 h sur sel et diminue légèrement sur eau (pour 8 h) comparé au contrôle, tandis qu'il augmente significativement sur sel et sur eau à la lumière (pour 8 h). Chez Saba, E à partir de (-F1,2) à l'obscurité diminue considérablement sur sel et moins intensivement sur eau, tandis qu'à la lumière il augmente considérablement sur eau, et n'augmente pas sur sel comparé au contrôle. Chez Saâda, E à partir de (-F1) sur sel augmente considérablement à la lumière et diminue significativement à l'obscurité, tandis que sur eau à la lumière et à l'obscurité E reste semblable à celui du contrôle. Chez Saâda, E à partir de (-F1,2) sur sel diminue aussi à l'obscurité mais augmente spectaculairement à la lumière tandis que sur eau il augmente seulement à la lumière comparé au contrôle. Pour Saâda et Saba, E à partir de (-F1,2) diminue encore considérablement sur sel à l'obscurité comparé à PI maintenue aussi sur sel à l'obscurité. Ces résultats indiquent que les feuilles 3, 4 et l'apex stimulent E. L'activité de ces jeunes parties est stimulée beaucoup par la lumière, par les feuilles matures (F1 et F2) à l'obscurité et par les sels (KCl). L'ampleur de l'effet des feuilles matures est génotype-dépendante (élevée chez Saâda et Saba, faible chez Achtar et nulle chez Tegye<sup>32</sup>), suggérant que la racine aussi bien que la partie aérienne est probablement impliquée dans la régulation interne de E. Ces résultats sont en faveur de l'existence de deux voies de synthèse de l'AIA impliquées dans le contrôle de E.

**Mots clés:** feuilles matures; apex; efflux du  $\text{NO}_3^-$ ; blé; sels; génotype

### Abstract

The effect of the mature leaves in the control of  $\text{NO}_3^-$  efflux (E) by the apex was studied, using three experimental treatments: intact plants (IP), (-L1) defoliated plants (IP minus the first leaf), and (-L1,2) defoliated plants (IP minus the first and second leaves). Data show that in Tegye32, E increases in light and dark and in water and salt for both defoliation treatments ([ -L1] and [-L1,2]), except for dark-water of (-L1) plants. In Achtar, E from (-L1) and (-L1,2) plants increases only in dark-salt compared to IP in light-salt. In Saba, E from (-L1) plants in dark increases only before 4 h in salt and slightly decreases in water (for 8 h) compared to control, while in light it increases significantly in salt and water (for 8 h). E from Saba (-L1,2) plants in dark decreases considerably in salt and less intensively in water, whereas in light it increases considerably in water, and is not increased in salt compared to control. In Saâda, E from (-L1) plants in salt increases considerably in light and decreases significantly in dark, whereas in water E remains similar to that of the control in light and dark. E from Saâda (-L1,2) plants in salt decreases also in dark but increases dramatically in light, whereas in water it increases only in light compared to the control. For Saâda and Saba, E from (-L1,2) plants decreases again considerably in dark-salt compared to IP maintained also in dark-salt. These data indicate that the leaves 3 and 4 and apex stimulate E. The activity of these young parts is much more enhanced by light, by the mature leaves (L1 and L2) in dark and by KCl-salt. The relative size of the mature leave effect is genotype-dependent (high in Saâda and Saba, low in Achtar and nil in Tegye32), suggesting that root as well as shoot is likely involved in the internal regulation of E. These data are in favour of the existence of two pathways of AIA synthesis which are involved in the control of E.

**Key words:** mature leaves; apex;  $\text{NO}_3^-$  efflux; wheat; salts; genotype

## Introduction

$\text{NO}_3^-$  uptake is the result of the net influx and efflux which are regulated independently (Aslam et al., 1995; Clarkson, 1986). The role of either nitrate flux in the regulation of uptake is still a matter of debate. Several studies showed that uptake is completely controlled by influx (Lee and Drew, 1986; Oscarson et al. 1987; Matsson et al., 1991, whereas other studies revealed that changes of nitrate efflux explained variation in uptake (Breteler and Nissen, 1982; Deane-drummond, 1986; Ter Steege et al., 1999). For Clarkson (1986) uptake is regulated at long-term by influx and at short-term by efflux. Little is known about this complex interaction between nitrate influx and efflux which is not yet completely understood.

Several external and internal factors have been found to affect uptake (Ismande and Touraine, 1994; MacDuff et al., 1994; Aslam et al., 1995; Casadesus et al., 1995; Ter Steege et al., 1999), however, the factors by which plant adapts uptake to global N demand remain unknown. Close relationships are found between relative growth rate and nitrate efflux and between nitrate translocation to shoot and nitrate efflux (Ter Steege et al., 1999). Amino acids and organic acids have been suggested to be involved in information exchange between root and shoot via phloem transport (Muller and Touraine, 1992; Touraine et al., 1992; Lainé et al., 1995; Delhon et al., 1995). It was found that amino acids reduce uptake by their accumulation in root (Muller and Touraine, 1992), whereas malate increases directly uptake (Touraine et al., 1988) but the mechanism of action of both kinds of compounds on influx and efflux both singly and/or in interaction remains unknown.

The involvement of shoot in this regulation has been tested by leaf excision (Jarvis and MacDuff, 1989; MacDuff et al., 1989; MacDuff et al., 1992; Abdellaoui et al., 2001). They have found that uptake decreases in defoliated plant (MacDuff et al., 1992), while efflux decreases in excised root and decapitated plant and increases in defoliated plant in light and dark compared to intact plant (Abdellaoui et al., 2001), leading these authors to suggest that apex stimulates efflux and leaves 1, 2 and 3 reduce it. However, neither the extent of mature and still expanding leave contributions nor the mechanism of this control and the nature of the biological shoot signal which regulates root E are well understood. Moreover, Peuke et al. (1996) demonstrated that N flow and metabolism depend on salt treatment which was also found to affect  $\text{NO}_3^-$  loss (BenDriss Amraoui et al., 2000) but one cannot well know whether salt effects efflux regulation. The aim of this paper was to examine the effect of mature leaves in the apex control of  $\text{NO}_3^-$  efflux and the effect of salt on this control.

## Materials and methods

### Plant material and growing conditions

Wheat seeds (*Triticum aestivum* L., var. Achtar, Saâda, Saba and Tegye32) disinfected for 5 min in sodium hypochlorite (37 g/l) were soaked for 8 h in distilled water and then allowed to germinate for 6 days on moist cheesecloth in darkness at 18 to 20°C. Plants were planted in groups of 25 in plastic holders and placed in 5 litres  $\text{NO}_3^-$  solution. The  $\text{NO}_3^-$  solution at pH 5.5 contained 3 mM  $\text{KNO}_3$ , 2.5 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.75 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 mM  $\text{NaCl}$ , 0.75 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 6  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 48.5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 16.5  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  and 0.5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . Iron was added as 10 mg of  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA per litre of  $\text{NO}_3^-$  solution. Solutions were constantly aerated and changed every three days. Growth was carried out in controlled chamber where light was applied during a 16 h photoperiod by white fluorescent bulbs (mixolamp 160W) and tubes (40W) to give 2000 lux at pot level. Temperature was maintained at 21°C in light period and 18°C in dark period. Relative humidity was about 65%.

### Plant treatments

On the 21<sup>st</sup> day after soaking, counted from the base the first (L1) and the second (L2) leaves had reached full expansion whereas the third (L3) and the fourth (L4) were young still expanding leaves in all varieties. Three hours after the start of the light period, two defoliation experiments were conducted in which all lamina tissue of leaf above the base was removed. In the first experiment, L1 is removed but L2, L3, L4 and apex are not touched: (-L1). In the second, L1 and L2 are removed but L3, L4 and apex are not touched: (-L1,2). Four intact or defoliated plant roots of each variety were rinsed three times with distilled water and placed in light or dark in a test tube containing 40 ml of distilled water or 40 ml of KCl-salt solution, at pH 5.5, similar to the complete nutrient solution except that  $\text{NO}_3^-$  salts were replaced by 3 mM KCl and 2.5 mM  $\text{CaSO}_4$ . The solutions were constantly aerated. At the end of the first hour, the roots were placed in another 40 ml of the identical solution for 1 h. The sequence was continued through 2-8 h and the medium was changed every two hours. At the end of the experimental period (8 h), the plants were removed; roots and shoots were excised, dried and weighed.  $\text{NO}_3^-$ -N leaked out from the roots to the solutions at different times were concentrated separately in 2 ml of distilled water and determined according to the method of Cataldo et al. (1975). For each of the four varieties four repetitions (each of four plants) were realized for each treatment. For each repetition five determinations were made during the time with the same plants. In the Figures, nitrate efflux is given as  $\mu\text{g}$   $\text{NO}_3^-$ -N per root dry weight.

The data were analysed by ANOVA (analysis of variance) to prove the significant difference between varieties and between treatments. Standard errors were calculated for all means and where no error bars appear, the standard error falls within the size of the symbol.



## Results and discussion

Simulation model already may give acceptable predictions of chloride, sulfate and  $\text{NO}_3^-$ -N leaching (White et al., 1998; Smith et al., 1998). They have found that nitrate leached below 0.25 m was 31 and 77 kg N/ha but only 4.2 and 12 kg N/ha leached beyond the root-zone, respectively. However, even if root growth into the subsoil and uptake may be effective in reducing the downward movement of  $\text{NO}_3^-$ -N and increasing the soil alkalinity (Touraine et al., 1988), leaching of  $\text{NO}_3^-$ -N from its zone of production may produce very high acidity (2.2 to 5.5 kmol  $\text{H}^+$ /ha, Smith et al., 1998), leading to the need for added alkalinity whenever the biomass is not returned to the soil.

Under such conditions, acidification alone or in combination with the effects of environmental pollutants or nutritional stress may affect the availability of nutrient and ion uptake rates, root elongation and morphological parameters of plants causing damage to plants (Sas and Mercik, 1996; Tari, 1997). This acidification by perturbing  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  increases  $\text{H}^+$ -ATPase and anion protein channel activities which may also cause  $\text{NO}_3^-$  efflux from roots (Smith and Reid, 1991; Aslam et al., 1995; Beffagna et al., 1995; Johannes et al., 1998). Moreover, in spite of the fact that  $\text{NO}_3^-$  is widespread water pollutant in many agricultural regions (McLay et al., 1991), has disastrous effect on biodiversity and cause toxicity problems for the consumer (methemoglobinemia) if its concentration in water exceeds the drinking water standard (Willis et al., 1997), neither the regulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake nor the mechanism, the physiological significance and the control of  $\text{NO}_3^-$  efflux are currently well understood (MacDuff et al., 1992; Ter Steege et al., 1999; Scheurwater et al., 1999; Abdellaoui et al., 2001).

In Tegye32, E increases in light- and dark-salt treatments of both defoliation treatments ([L1] and [L1,2]) and in light- and dark-water treatments of (-L1,2) and only in light-water treatment of (-L1) compared to control, whereas E in dark-water of (-L1) does not increase and remain lower than in control (Figs. 1 and 2). Moreover, this increase of E is significantly higher in dark than in light after the removal of both leaves (L1 and L2). This result is in accordance with data of Abdellaoui et al. (2001) and suggests that the residual parts (L3, emerged L4 and apex) in defoliated plants stimulate E more in dark than in light. This observation is in agreement with the hypothesis which suggests that light may reduce this effect by oxidation of the chemical compound to which E is sensitive. Moreover, the fact that the effect of the residual parts appear more clear in salt-(-L1,2) plants (see E in salt- and

water-dark in [-L1] and [-L1,2] compared to control) and that E from (-L1) plants does not increase in dark-water indicate that KCl-salt activates more the effect of residual parts on E.

In Achtar, E from (-L1) and (-L1,2) plants increases only in dark-salt treatment compared to IP in light-salt, whereas in light-salt and in light- and dark-water of both defoliation treatments E is similar or lower than that of the control (Figs. 1 and 2). This shows that in Achtar E increases in salt only when seedlings are defoliated and maintained in dark. The fact that in Achtar light decreases dramatically E suggests an effect of light on the stimulating effect of the residual parts on E probably by degradation/oxidation of auxin (AIA) as suggested by Abdellaoui (2001). The fact that light may easily reduce this effect is in favour of low synthesis of AIA and of the hypothesis according to which leaves 1 and 2 sustain the apex control of E in Achtar since E decreases more in light-salt and light-water when L1 and L2 are suppressed (Figs. 1 and 2). However, the fact that the suppression of leaf 2 with leaf 1, compared to control, increases E less intensively, while the suppression of leaf 1 alone increases E two times higher than that of leaves 1 and 2 suggests that leaf 2 sustains probably the high E from (-L1) plants in dark-salt (Figs. 1 and 2).

In Saba, E from (-L1) plants increases only before 4 h in dark-salt or slightly decreases in dark-water (for 8 h) compared to control, while it increases significantly in light-salt and light-water (for 8 h). Most surprisingly, E from (-L1,2) plants decreases considerably in dark-salt and less intensively in dark-water, whereas it increases considerably in light-water, and is not increased in light-salt compared to control (Figs. 1 and 2). However, the fact that in light-salt (-L1,2) plants of Saba do not increase E more than the control, but increase significantly only in light-water, suggests that KCl-salt by acting on the root membrane stability and/or on substance fluxes within plant increases E in (-L1,2) and in the control and thus masks the stimulating effect of the residual parts (L3, emerged L4 and apex) on E after defoliation in this variety. In an other study (Fig. 3, **chapter 7**), similar data have been found when leaf 3 is also removed with leaves 1 and 2 in Saba, indicating that this KCl-salt effect in light is also linked to roots.

Furthermore, this effect of light and dark on E in defoliated plants of Saba, is nearly completely opposite to that of Achtar. For example in (-L1,2) plants of Achtar, dark increases E (only in salt) and light decreases E (in salt and water), while in Saba dark decreases E (in salt and water) and light increases E (only in water). This observation indicates that in Achtar light prevents the stimulating effect of the residual parts of defoliated plants on E, whereas in Saba this prevention occurred in dark. This implies that the limitation of this effect in Achtar is due to low synthesis and/or high oxidation of AIA by light and in Saba to high synthesis

and/or low oxidation of AIA by light. However, the fact that E does not increase in dark (in [-L1] and [-L1,2]) but decrease significantly and only after the cut of leaf 2 with leaf 1 in both mediums (salt and water) confirms again (as in Achtar) the involvement of leaf 2 in the apex regulation of E and suggests that in dark the effect of apex involves the leaf 2 and other chemical reaction, which is indispensable for the synthesis of AIA to which E is sensitive. Moreover, the fact that in light E increases (in water) or remains similar (in salt) to that of the control suggests that in light even if the leaf 1 and especially leaf 2 are removed the meristems of leaf 3, of emerged leaf 4 and of apex are able to synthesize sufficient quantities of AIA to prevent its decrease by light oxidation and to maintain its control on E.

Taken together, these results indicate that leaf 2 is probably more implied in the synthesis of AIA in dark period in which it is indispensable to maintain E increase in Saba and in Achtar (in light and dark). This role of leaf 2 is in agreement with data of Champigny and Talouizte (1981), who have found that in 14-day-old wheat plants, leaf 2 is the sole leaf which exports the greatest percentage of assimilated  $^{14}\text{C}$  to the fourth leaf and apex (51% during 5 h in light) compared to leaf 1 and leaf 3 which export only 16.5% and 16.8%, respectively, to these plant parts.

In Saâda, E from (-L1) plants increases considerably in light-salt and decreases significantly in dark-salt, whereas in light- and dark-water E from these plants remains similar to that of the control (Fig. 1). However, E from (-L1,2) plants decreases also in dark-salt but increases dramatically in light-salt, whereas in water it increases only in light compared to the control (Fig. 2). This data is in line with the above-shown effect of KCl-salt on the apex control of E because in light-water defoliation produces any effect on E (in [-L1]) or slight effect (in [L1,2]) compared to that produced in light-salt in both defoliation treatments (Figs. 1 and 2). However, the fact that in dark-salt E does not increase from (-L1,2) plants compared to (-L1) plants and that in light-salt E increases more from (-L1,2) plants than from (-L1) plants compared to control suggests that in Saâda leaf 1 as well as leaf 2 is also involved in the regulation of E by the apex. Moreover, the fact that E decreases in dark-salt compared to the control and to light-salt in both defoliation treatments clearly demonstrates here with no fear that the mature leaves are involved certainly in the apex control of E in dark.

Nevertheless, the fact that in Tegye32 dark increases more E than light suggests that light may decrease AIA by oxidation but darkness prevents this oxidation and stimulates the synthesis of AIA by chemical compounds stored in the residual parts (young parts: L3, emerged L4 and apex) as found for the cytokinin (CK) synthesis in chloroplasts by Benková et al. (1999), who have reported that chloroplasts react to darkness with specific changes in

the level of various CK metabolites. In Achtar, the fact that light decreases E and darkness increases it is in line with this suggestion. But in Saba and Saâda, the fact that E from (-L1) and (-L1,2) plants decreases considerably only in dark and not in light, compared to IP, confirms the involvement of leaves 1 and 2 in the apex control of E in the dark period, leading us to the assumption that if AIA effects this control it may involve, at least in part, two pathways of AIA synthesis. The first pathway which occurs in light and uses the newly synthesized compounds and the second which occurs in dark and utilizes the previously accumulated precursors of AIA (in L1 and L2 of Saba and Saâda), as reported for CK by Benková et al. (1999). They have found that in wheat accumulation of glucosides (CK precursor) in chloroplasts is substantially potentiated by dark treatment of the leaves, showing a specific reaction of chloroplasts compared with the rest of the cell in their CK accumulation and/or metabolism in response to darkness. However, some of the oldest auxin studies assert that exogenous AIA has no effect on tobacco leaf mesophyll growth (Avery, 1935; Went and Thimann, 1937), but recent studies using more mature leaf material have reported that ATPase and proton-pumping activities of isolated and purified plasma membrane (PM) from tobacco leaves are stimulated by AIA (Santoni et al., 1990, 1991; Masson et al., 1996). These data show that leaves develop responsiveness to auxin as they mature, indicating a possible existence of stored metabolites of AIA in the mature leaves as suggested in the present study in darkness which shows that the mature leaves 1 and 2, which likely accumulate more AIA metabolites, are hence more predisposed to AIA synthesis and to sustain the apex control of efflux.

To test this hypothesis we compare the E from (-L1,2) plants in dark-salt to that from IP in dark-salt (Fig. 3). In Tegye32, no difference between these plants is observed, whereas dark increases again E in Achtar and decreases again E in Saâda and Saba in salt just as we have obtained between (-L1,2) plants in dark and IP in light (Fig. 2). This data confirms the involvement of leaves 1 and 2 in the regulation of E by the apex because when these leaves are not removed (like in IP in dark) the E is not decreased even if these plants are maintained in dark during 8 h, indicating that L1 and L2 sustain probably AIA synthesis in dark.

Johannes et al. (1998) found that in algae  $\text{Cl}^-$  efflux is activated directly by cytosolic  $\text{H}^+$ . In addition to this, Aslam et al. (1995) demonstrate that external acidic pH, which may activates  $\text{H}^+$ -ATPase activity, stimulates  $\text{NO}_3^-$  efflux. Recent investigations have reported that ATPase and proton-pumping activities of isolated and purified PM (Santoni et al., 1990, 1991; Masson et al., 1996) and  $\text{NO}_3^-$  efflux (Abdellaoui, 2001) are stimulated by auxines

which increase proton efflux and probably also  $K^+$  influx by cytosolic acidification (Claussen et al., 1997).

Function for anion channels in the control of  $pH_{\text{cyt}}$  is suggested in algae (Smith and Reid, 1991; Johannes et al., 1998) and higher plants (Beffagna et al., 1995) and the failure of such anion channel activity would severely compromise the ability of the  $H^+$ -ATPase pump to effect control of  $pH_{\text{cyt}}$  (Blatt et al., 1990). Furthermore, much direct and indirect evidence exist indicating that AIA modulates other ion channel plasma membrane conductances in addition to the activity of PM  $H^+$ -ATPase in various systems (Marten et al., 1991; Lohse et al., 1992; Rück et al., 1993; Blatt and Theil, 1994; Zimmermann et al., 1994; Keller and Van Volkenburgh, 1996a, 1996b). Taken together, these observations suggest that the chemical signal (AIA), which may be here descended from the apex, activates  $NO_3^-$  E by its stimulating effect on  $H^+$ -ATPase,  $H^+$  efflux and  $K^+$  influx induced by cytosolic acidification.

Recently, Siebrecht and Tischner (1999) found that  $NO_3^-$  concentration in xylem sap dropped immediately after transfer of decapitated plants to N-free medium, indicating the close connection between  $NO_3^-$  uptake and xylem loading. However, they also found that even after 24 h of  $NO_3^-$  depletion there is still a low  $NO_3^-$  concentration found in the xylem sap, indicating a very slowly occurring unloading of the storage tissue which is never sufficient to maintain the  $NO_3^-$  concentration in the xylem sap (Siebrecht and Tischner, 1999). This implies that here even if  $NO_3^-$  concentration in xylem sap may drop immediately after transfer of defoliated plants to N-free medium (as used here in the bath solution), E from roots varies and remains, at least in high part, under the control of the apex and the mature leaves.

This observation may also suggest that  $NO_3^-$  storage in root vacuoles, which contributes slightly to maintain  $NO_3^-$  concentration in xylem sap, may be also slightly involved in the control of E here because it assumed that the E from the vacuole into the cytoplasm is slower than E from the cytoplasmic pool into the external medium even if cytoplasmic nitrate pool in the roots is small relative to the vacuole (Kleinhofs and Warner, 1990). The fact that MacDuff et al. (1989) have found that defoliation increases the vacuolar storage demand in roots of grasses is in favour of the low involvement of root vacuole  $NO_3^-$  in efflux from defoliated plants here.

In contrast to this, it has recently been reported that in intact 6-day-old barley plants, which have grown 24 h on  $NO_3^-$  (10 mM), remobilisation of root cell vacuolar  $NO_3^-$  during the first 24 h of  $NO_3^-$  withdrawal is much slower from cortical cell vacuoles than from epidermal cell vacuoles (Van der Leij et al., 1998). They have also found that during short-term changes (20 min exposure to N-free solution) cytosolic  $NO_3^-$  is maintained relatively

unchanged and that during 24 h vacuolar nitrate is readily mobilised to maintain the cytosolic  $\text{NO}_3^-$  concentration, while  $\text{NO}_3^-$  E from the roots ceased after the initial 5 h of the N-free incubation period. This observation indicates close relationships and synchronization between root  $\text{NO}_3^-$  E and vacuolar  $\text{NO}_3^-$  remobilisation, indicating that root cytosolic  $\text{NO}_3^-$  concentration is maintained by  $\text{NO}_3^-$  E from the vacuole which may be also stimulated by descended AIA from the apex. This supposed that  $[\text{NO}_3^-]_{\text{cyt}}$  and  $[\text{NO}_3^-]_{\text{xylem sap}}$  may be the chemical signals which triggered off the synthesis and translocation of AIA from the apex and the synthesis of AIA precursors in the chloroplasts of the mature leaves in darkness.

### References

- Abdellaoui, A. 2001. Absorption et assimilation de l'azote chez le blé (*Triticum aestivum* L.): mise en évidence d'une régulation de l'efflux des ions  $\text{NO}_3^-$  racinaires par la partie aérienne. Thèse d'Etat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, FES.
- Abdellaoui, A., Larhnm, A., Talouizte, A. 2001. Mise en évidence d'une régulation de l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  racinaire par la partie aérienne chez quatre cultivars de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Sais, Jouda, Marchouch et Khair: influence de la lumière. Can. J. Bot. 79, 398-403.
- Aslam, M., Travis, R. L., Huffaker, R. C. 1995. Effect of pH and calcium on short-term  $\text{NO}_3^-$  flux in root of barley seedling. Plant Physiol. 108, 727-734.
- Beffagna, N., Romani, G., Gatti, L. 1995. Changes in chloride fluxes and cytosolic pH induced by abscisic acid in *Elodea densa* leaves. Bot. Acta 108, 74-79.
- Benková, E., Witters, E., Van Dongen, W., Kolář, J., Motyka, V., Brzobohatý, B., Van Onckelen, H. A., Macháčková, I. 1999. Cytokinins in tobacco and wheat chloroplast. Occurrence and changes due to light/dark treatment. Plant Physiol. 121, 245-251.
- Blatt, M. R., Theil, G. 1994.  $\text{K}^+$  channels of stomatal guard cells: bimodal control of  $\text{K}^+$  inward-rectifier evoked by auxin. Plant J. 5, 55-68.
- Blatt, M. R., Beilby, M. J., Tester, M. 1990. Voltage dependence of the *Chara* proton pump revealed by current-voltage measurement during rapid metabolic blockade with cyanide. J. Membr. Biol. 114, 205-224.
- Breteler, H., Nissen, P. 1982. Effect of exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilization by dwarf bean. Plant Physiol. 70, 754-759.
- Casadesus, J., Tapia, L., Lambers, H. 1995. Regulation of  $\text{K}^+$  and  $\text{NO}_3^-$  fluxes in roots of sunflower (*Helianthus annuus*) after changes in light intensity. Physiol. Plant. 93, 279-285.
- Cataldo, D. A., Haroon, M., Schrader, L. E., Youngs, V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 6, 71-80.
- Champigny, M. L., Talouizte, A. 1981. Photosynthates distribution and metabolic fate in relation to nitrogen metabolism in wheat plants. In: Akoyunoglou, G., (Ed.), Photosynthesis IV. Regulation of carbon metabolism. Balaban International Science Services, Philadelphia, pp. 645-652.
- Clarkson, D. T. 1986. Regulation of the absorption and release of nitrate by plant cells: a review of current ideas and methodology. In: Lambers, H., Neeteson, J., Stulen, I., (Eds),

- Physiological, ecological and applied aspects of nitrogen metabolism in higher plants. Nijhoff, M., Dordrecht, pp. 3-27.
- Claussen, M., Lüthen, H., Blatt, M., Böttger, M. 1997. Auxin-induced growth and its linkage to potassium channels. *Planta* 201, 227-234.
- Deane-Drummond, C. E. 1986. Nitrate uptake into *Pisum sativum* L. cv. Feltham First seedlings: a commonality with nitrate uptake into *Chara Corallina* and *Hordeum vulgare* through a substrate cycling model. *Plant Cell Environ.* 9, 41-48.
- Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., Passama, L. 1995. Diurnal regulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake in soybean plants. II. Relationship with accumulation of  $\text{NO}_3^-$  and asparagine in the roots. *J. Exp. Bot.* 46, 1595-1602.
- Imssande, J., Touraine, B. 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiol.* 105, 3-7.
- Jarvis, S. C., MacDuff, J. H. 1989. Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. I. Recovery of uptake and growth and their interactions. *J. Exp. Bot.* 40, 965-975.
- Johannes, E., Crofts, A., Sanders, D. 1998. Control of  $\text{Cl}^-$  efflux in *Chara corallina* by cytosolic pH, free  $\text{Ca}^{2+}$ , and phosphorylation indicates a role of plasma membrane anion channels in cytosolic pH regulation. *Plant Physiol.* 118, 173-181.
- Keller, C. P., Van Volkenburgh, E. 1996a. The electrical response of *Avena* coleoptile cortex to auxins: evidence in vivo for activation of a  $\text{Cl}^-$  conductance. *Planta* 198, 404-412.
- Keller, C. P., Van Volkenburgh, E. 1996b. Osmoregulation by oat coleoptile protoplasts. Effects of auxin. *Plant Physiol* 110, 1007-1016.
- Kleinhofs, A., Warner, R. L. 1990. Advances in nitrate assimilation. In: Mifflin, B.J., Lea, P.J., (Ed.), *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Intermediary nitrogen metabolism*. Vol.16. Academic Press, pp. 89-120.
- Lainé, P., Ourry, A., Boucaud, J. 1995. Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L.: effects of localized nitrate supply. *Planta* 196, 77-83.
- Lee, R. B., Drew, M. C. 1986. Nitrogen-13 studies of nitrate fluxed in barley roots. II. Effect of plant N-status on the kinetic parameters of nitrate influx. *J. Exp. Bot.* 37, 1768-1779.
- Lohse, G., Hedrich, R. 1992. Characterization of the plasma-membrane  $\text{H}^+$ -ATPase from *Vicia faba* guard cells: modulation by extracellular factors and seasonal changes. *Planta* 188, 206-214.
- MacDuff, J. H., Jackson, S. B. 1992. Influx and efflux of nitrate and ammonium in Italian ryegrass and white clover roots: Comparisons between effects of darkness and defoliation.



- J. Exp. Bot. 43, 525-535.
- MacDuff, J. H., Jarvis, S. C., Mosquera, A. 1989. Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. J. Exp. Bot. 40, 977-984.
- MacDuff, J. H., Jarvis, S. C., Cockburn, J. E. 1994. Acclimation of  $\text{NO}_3^-$  fluxes to low root temperature by *Brassica napus* in relation to  $\text{NO}_3^-$  supply. J. Exp. Bot. 45, 1045-1056.
- Marten, I., Lohse, G., Hedrich, R. 1991. Plant growth hormones control voltage-dependent activity of anion channels in plasma membrane of guard cells. Nature 353, 758-762.
- Masson, F., Szponarski, W., Rossignol, M. 1996. The heterogeneity of the plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase response to auxin. Plant Growth Reg. 18, 15-21.
- Mattson, M., Johansson, E., Lundborg, T., Larsson, M., Larsson, C. M. 1991. Nitrogen utilization in N-limited barley during vegetative and generative growth. I. Growth and nitrate uptake kinetics in vegetative cultures grown at different relative addition rates of nitrate-N. J. Exp. Bot. 42, 197-205.
- McLay, C. D. A., Cameron, K. C., McLaren, R. G. 1991. Effect of time of application and continuity of rainfall on leaching of surface-applied nutrients. Aust. Soil Res. 29, 1-9.
- Muller, B., Touraine, B. 1992. Inhibition of  $\text{NO}_3^-$  uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. J. Exp. Bot. 43, 617-623.
- Oscarson, P., Ingemarsson, B., Af Ugglas, M., Larsson, C. M. 1987. Short-term studies of  $\text{NO}_3^-$  uptake in *Pisum* using  $^{13}\text{NO}_3^-$ . Planta 170, 550-555.
- Peuke, A. D., Glaab, J., Kaiser, W. M., Jeschke, W. D. 1996. The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. IV. Flow and metabolism of inorganic nitrogen and malate depending on nitrogen nutrition and salt treatment. J. Exp. Bot. 47, 377-385.
- Rück, A., Palme, K., Venis, M. A., Napier, R. M., Felle, H. H. 1993. Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin binding protein in the auxin stimulation of plasma membrane current in *Zea mays* protoplasts. Plant J. 4, 41-46.
- Santoni, V., Vansuyt, G., Rossignol, M. 1990. Differential auxin sensitivity of proton translocation by plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase from tobacco leaves. Plant Sci. 68, 33-38.
- Santoni, V., Vansuyt, G., Rossignol, M. 1991. The changing sensitivity of auxin of the plasma-membrane  $\text{H}^+$ -ATPase: relationship between plant development and ATPase content of membranes. Planta 185, 227-232.
- Sas, L., Mercik, S. 1996. The growth and mineral composition of the three apple rootstocks cultivated on three levels of soils pH (4, 5, 6) in the field conditions. Plant Physiol.

- Biochem. Special Issue on the 10<sup>th</sup> FESPP Congress, Florence, Italy, Sept. 9-13, 1996, S17-35, 223.
- Scheurwater, I., Clarkson, D. T., Purves, J. V., van Rijt, G., Saker, L. R., Welschen, R., Lambers, H. 1999. Relatively large nitrate efflux can account for the high specific respiratory costs for nitrate transport in slow-growing grass species. *Plant Soil* 215, 123-134.
- Siebrecht, S., Tischner, R. 1999. Changes in the xylem exudate composition of poplar (*P. tremula* x *P. alba*)-dependent on the nitrogen and potassium supply. *J. Exp. Bot.* 50, 1797-1806.
- Smith, F. A., Reid, R. J. 1991. Biophysical and biochemical regulation of cytoplasmic pH in *Chara corallina* during acid loads. *J. Exp. Bot.* 42, 173-182.
- Smith, A. C. J., Dunin, B. F. X., Zegelin, C. S. J., Poss, B. D. R. 1998. Nitrate leaching from a Riverine clay soil under cereal rotation. *Aust. J. Agric. Res.* 49, 379-89.
- Tari, I. 1997. Nitrite in the root zone increases the peroxidase activity of wheat roots at pH 4.0. *Cereal Research Communications*, 25, 197-202.
- Ter Steege, M. W., Stulen, I., Wiersema, P. K., Posthumus, F., Vaalburg, W. 1999. Efficiency of nitrate uptake in spinach: impact of external nitrate concentration and relative growth rate on nitrate influx and efflux. *Plant Soil* 208, 125-134.
- Touraine, B., Grignon, N., Grignon, C. 1988. Charge balance in NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-fed soybean. Estimation of K<sup>+</sup> and carboxylate recirculation. *Plant Physiol.* 88, 605-612.
- Touraine, B., Muller, B., Grignon, C. 1992. Effect of phloem-translocated malate on NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by roots of intact soybean plants. *Plant Physiol.* 99, 1118-1123.
- Van der Leij, M., Smith, S. J., Miller, A. J. 1998. Remobilisation of vacuolar stored nitrate in barley root cells. *Planta* 205, 64-72.
- Went, F. M., Thimann, K. V. 1937. *Phytohormones*. MacMillan, New York.
- White, A. C. R. E., Heng, A. L. K., Magesan, B. G. N. 1998. Nitrate leaching from a drained, sheep-grazed pasture. II. Modelling nitrate leaching losses. *Aust. J. Soil Res.* 36, 963-77.
- Willis, G. H., Southwick, L. M., Fouss, J. L., Carter, C. E., Rogers, J. S. 1997. Nitrate losses in runoff and subsurface drain effluent from controlled-water-table plots. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 566-573.
- Zimmermann, S., Thomine, S., Guern, J., Barbier-Brygoo, H. 1994. An anion current at the plasma membrane of tobacco protoplasts shows ATP-dependent voltage regulation and is modulated by auxin. *Plant J.* 6, 707-716.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abdellaoui, A. 2001. Absorption et assimilation de l'azote chez le blé (*Triticum aestivum* L.): mise en évidence d'une régulation de l'efflux des ions  $\text{NO}_3^-$  racinaires par la partie aérienne. Thèse d'Etat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, FES.
- Abdellaoui, A., Larhnm, A., Talouizte, A. 1999. Accumulation, absorption et assimilation des nitrates chez différentes variétés de Blé tendre marocain: influence de la lumière. Can. J. Bot. 77, 1485-1489.
- Abdellaoui, A., Larhnm, A., Talouizte, A. 2001. Mise en évidence d'une régulation de l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  racinaire par la partie aérienne chez quatre cultivars de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Sais, Jouda, Marchouch et Khair: influence de la lumière. Can. J. Bot. 79, 398-403.
- Agüera, E., Poblete, L., de la Haba, P., Maldonado, J. M. 1999. Light modulation and in vitro effects of adenine nucleotides on leaf nitrate reductase activity in cucumber (*Cucumis sativus*) Physiol. Plant. 105, 218-223.
- Allen, S., Raven, J. A. 1987. Intracellular pH regulation in *Ricinus communis* grown with ammonium or nitrate as N source: the role of long distance transport. J. Exp. Bot. 38, 580-596.
- Améziane, R., Limami, M. A., Morot-Gaudry, J.-F. 1994. Fructan biosynthesis and SST activity in excised leaves of *Cichorium intybus* L. In: de Kouchkovsky, Y., Larher, F., (Eds), Plant Sci. SFPV-Université de Rennes I, pp. 123.
- Améziane, R., Limami, M. A., Noctor, G., Morot-Gaudry, J.-F. 1995. Effect of nitrate concentration during growth on carbon partitioning and sink strength in chicory. J. Exp. Bot. 46, 1423-1428.
- Améziane, R., Deléens, E., Noctor, G., Morot-Gaudry, J.-F., Limami, M. A. 1997. Stage of development is an important determinant in the effect of nitrate on photoassimilate ( $^{13}\text{C}$ ) partitioning in chicory (*Cichorium intybus*). J. Exp. Bot. 48, 25-33.
- Andrews, M. 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. Plant Cell Environ. 9, 511-519.
- Andrews, M., Morton, J. D., Lieffering, M., Bisset, L. 1992. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of a range of temperate cereals and pasture grasses. Ann. Bot. 70, 271-276.
- Andrews, M., Sutherland, J. M., Thomas, R. J., Sprent, J. I. 1984. Distribution of nitrate reductase activity in six legumes: the importance of the stem. New Phytol. 98, 301-310.
- Andriolo, J. L., Le Bot, J., Gary, C., Sappe, G., Orlando, P., Brunel, B., Sarrouy, C. 1996. An experimental set-up to study carbon, water, and nitrate uptake rates by hydroponically

- grown plants. J. Plant Nutr. 19, 1441-1462.
- Aouad, A., Baaziz, M., Mergoum, M. 1998. Evaluation des peroxydases comme marqueurs dans l'amélioration pour la tolérance à la salinité du blé et d'autres céréales. In: El Mtili, N., (Ed.), Act. J. Sc. sur le Blé Oujda, Maroc, pp. 50-55.
- Aslam, M., Huffaker, R. C., Rains, D. W., Rao, K. P. 1979. Influence of light and ambient carbon dioxide concentration on nitrate assimilation by intact barley seedlings. Plant Physiol. 63, 1205-1209.
- Aslam, M., Nielson, K., Travis, R. L., Rains, D. W. 1997. Nitrate uptake, efflux and in vivo reduction by *Pima* and *Acala* cotton cultivars. Crop Sci. 37, 1795-1801.
- Aslam, M., Oaks, A., Huffaker, R. C. 1976. Effect of light and glucose on the induction of nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. Plant Physiol. 58, 588-591.
- Aslam, M., Travis, R. L., Huffaker, R. C. 1992. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in root of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. Plant Physiol. 99, 1124-1133.
- Aslam, M., Travis, R. L., Huffaker, R. C. 1994. Stimulation of nitrate and nitrite efflux by ammonium in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. Plant Physiol. 106, 1293-1301.
- Aslam, M., Travis, R. L., Huffaker, R. C. 1995. Effect of pH and calcium on short-term  $\text{NO}_3^-$  flux in root of barley seedling. Plant Physiol. 108, 727-734.
- Aslam, M., Travis, R. L., Rains, D. W. 1996b. Evidence for substrate induction of a nitrate efflux system in barley roots. Plant Physiol. 112, 1167-1175.
- Aslam, M., Travis, R. L., Rains, D. W., Huffaker, R. C. 1996a. Effect of root perturbation and excision on nitrate influx and efflux in barley (*Hordeum vulgare*) seedling. Plant Physiol. 97, 425-432.
- Athwal, G. S., Huber, J. L., Huber, S. C. 1998. Phosphorylated nitrate reductase and 14-3-3 proteins. Site of interaction, effects of ions, and evidence for an AMP-binding site on 14-3-3 proteins. Plant Physiol. 118, 1041-1048.
- Ayling, S. M. 1993. The effect of ammonium ion on membrane potential and anion flux in roots of barley and tomato. Plant Cell Environ. 16, 297-303.
- Back, E. W., Dunne Schneiderbauer, A., De Framond, A., Rastogi, R., Rothstein, S. J. 1991. Isolation of spinach nitrite reductase gene promoter which confers nitrate inducibility on GUS gene expression in transgenic tobacco. Plant Mol. Biol. 17, 9-18.
- Bachmann, M., Huber, J. L., Liao, P.-C., Gage, D. A., Huber, S. C. 1996. The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacea oleracea*) leaves is a

- 14-3-3 protein. FEBS Lett. 387, 127-131.
- Barthes, L., Deléens, E., Bousser, A., Hoarau, J., Prioul, J.-L. 1996. Nitrate use and xylem exudation in detopped wheat seedlings: an early diagnosis for predicting varietal differences in nitrogen utilisation? Aust. J. Plant Physiol. 23, 33-44.
- Beevers, L., Hageman, R. H. 1980. Nitrate and nitrite reduction. In: Mifflin, B., (Ed.), Amino acids and derivatives. The biochemistry of plants. Vol. 5. Academic Press, New York, pp. 116-168.
- Behl, R., Tichner, R., Raschke, K. 1988. Induction of a high-capacity nitrate-uptake mechanism in barley roots prompted by nitrate uptake through a constitutive low-capacity mechanism. Planta 176, 235-240.
- BenDriss Amraoui, M. 1988. Absorption, assimilation et transport de l'azote inorganique ( $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ ) chez le Hêtre (*Fagus sylvatica* L.). Thèse d'université, Université de Nancy I, France.
- BenDriss Amraoui, M., Talouizte, A. 2001.  $\text{NO}_3^-$  affects carbohydrate losses from wheat root. Acta Agronomica Hungarica, 49, 43-52.
- BenDriss Amraoui, M., Malali, A., Talouizte, A. 2000. Salts in the root zone affect  $\text{NO}_3^-$ -N losses from wheat root in light: influence of genotype and darkness. Cereal Research Communications 28, 379-386.
- Benková, E., Witters, E., Van Dongen, W., Kolář, J., Motyka, V., Brzobohatý, B., Van Onckelen, H. A., Macháčková, I. 1999. Cytokinins in tobacco and wheat chloroplast. Occurrence and changes due to light/dark treatment. Plant Physiol. 121, 245-251.
- Bentrup, F.-W., Gogarten-boekels, M., Hoffman, B., Gogarten, J. P., Baumann, C. 1986. ATP-dependent acidification and tonoplast hyperpolarization in isolated vacuoles from green suspension cells of *Chenopodium rubrum* L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2431-2433.
- Ben-Zioni, A., Vaadia, Y., Lips, S. M. 1971. Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products in the shoot. Physiol. Plant. 24, 288-290.
- Bethke, P. C., Jones, R. L. 1997. Reversible protein phosphorylation regulates the activity of the slow-vacuolar ion channel. Plant J. 11, 1227-1235.
- Bloom, A. J., Sukrapanna, S. S., Warner, R. L. 1992. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. Plant Physiol. 99, 1294-1301.
- Blumwald, E., Poole, R. J. 1985. Nitrate storage and retrieval in *Beta vulgaris*: effects of nitrate and chloride on proton gradients in tonoplast vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3683-3687.

- Botrel, A., Magne, C., Kaiser, W. M. 1996. Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. *Plant Physiol. Biochem.* 34, 645-652.
- Bouaziz, A., Soudi, B. 1998. Fertilisation azotée du blé dur (*Triticum durum* Desf L.) en irrigué dans le doukkala (Maroc). *Actes inst. Agron. Vet. (Maroc)* 18, 139-150.
- Bowman, D. C., Devitt, D. A., Engelke, M. C., Rufty, T. W. 1998. Root architecture affects nitrate leaching from Bentgrass Turf. *Crop Sci.* 38, 1633-1639.
- Breteler, H., Arnozis, P. A. 1985. Effect of amino compounds on nitrate utilization by roots of dwarf bean. *Phytochem.* 24, 653-658.
- Breteler, H., Nissen, P. 1982. Effect of exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilization by dwarf bean. *Plant Physiol.* 70, 754-759.
- Breteler, H., Siegerist, M. 1984. Effect of ammonium on nitrate utilization by dwarf bean. *Plant Physiol.* 70, 754-759.
- Breteler, H., Hänisch-Ten-Cate, C. H., Nissen, P. 1979. Time course of nitrate uptake and nitrate reductase activity in nitrogen depleted dwarf bean. *Physiol. Plant* 47, 49-55.
- Brewitz, E., Larsson, C.-M., Larsson, M. 1996. Responses of nitrate assimilation and N translocation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to reduced ambient air humidity. *J. Exp. Bot.* 47, 855-861.
- Butz, R. G., Jackson, W. A. 1977. A mechanism for nitrate transport and reduction. *Phytochem.* 16, 409-417.
- Buysse, J., Smolders, E., Merckx, R. 1996. Modelling the uptake of nitrate by a growing plant with an adjustable root nitrate uptake capacity. I. Model description. *Plant Soil* 181, 19-23.
- Cacco, G., Dell'Agnola, G. 1984. Plant growth regulator activity of soluble humic complex. *Can. J. Soil Sci.* 62, 306-310.
- Cacco, G., Attinà, E., Gelsomino, A., Sidari, M. 2000. Effect of nitrate and humic substances of different molecular size on kinetic parameters of nitrate uptake in wheat seedlings. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163, 313-320.
- Campbell, W. H. 1996. Nitrate reductase biochemistry comes of age. *Plant Physiol.* 111, 355-361.
- Campbell, W. H. 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the Gap between biochemistry and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 277-303.

- Cárdenas-Navarro, R., Adamowicz, S., Robin, P. 1998. Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants: test of a feed back-based model. J. Exp. Bot. 49, 721-730.
- Cárdenas-Navarro, R., Adamowicz, S., Robin, P. 1999. Nitrate accumulation in plants: a role for water. J. Exp. Bot. 50, 613-624.
- Casadesus, J., Tapia, L., Lambers, H. 1995. Regulation of  $K^+$  and  $NO_3^-$  fluxes in roots of sunflower (*Helianthus annuus*) after changes in light intensity. Physiol. Plant. 93, 279-285.
- Chaillou, S., Rideout, J. W., Raper, C. D., Morot-Gaudry, J.-F. 1994. responses of soybean to ammonium and nitrate supplied in combination to the whole root system or separately in split-root system. Physiol. Plant. 90, 259-268.
- Chaillou, S., Morot-Gaudry, J.-F. Salsac, L., Lesaint, C., Jolivet, E. 1986. Compared effects of  $NO_3^-$  and  $NH_4^+$  on growth and metabolism of French bean. Physiol. Vég. 24, 679-687.
- Champigny, M. L. 1995. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. Photosynthesis Research 46, 117-127.
- Champigny, M. L., Foyer, C. H. 1992. Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis. Basis for a new concept. Plant Physiol. 100, 7-12.
- Champigny, M. L., Bismuth, E., Talouizte, A. 1984. The role of the roots in nitrate reduction and mobilization of the carbohydrate product of photosynthesis for amino acid synthesis in *Triticum aestivum* seedlings. In: Sironval, C., (Ed.), VI<sup>th</sup> Inter. Cong. on Photosynthesis, Bruxelles. Vol. III, pp. 875-878.
- Champigny, M. L., Van Quy, L., Valadier, M. H. 1991. Effet immédiat des nitrates sur la photoassimilation du  $CO_2$  et la synthèse du saccharose dans les feuilles de blé. C. R. Acad. Sci. 312, 469-476.
- Chapin, III F. S. 1990. Effects of nutrient deficiency on plant growth: evidence for centralized stress-response system. In: Davies, W. J., Jeffcoat, B., (Ed.), Importance of root to shoot communication in the responses to environmental stress. Monograph 21, British Society for Plant Growth Regulation, Bristol, pp. 135-148.
- Chapin, III F. S., Clarkson, D. T., Lenton, J. R., Walter, C. H. S. 1988. Effect of nitrogen stress and abscisic acid on nitrate absorption and transport in barley and tomato. Planta 173, 340-351.
- Cheng, C.-L., Acedo, G. N., Christinsin, M., Cronkling, M. A. 1992. Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reduction gene transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1861-1864.



- Chrispeels, M. J., Crawford, N. M., Schroeder, J. I. 1999. Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *Plant cell* 11, 661-675.
- Clarkson, D. T. 1985. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plant. *Annu. Re. Plant Physiol.* 36, 77-115.
- Clarkson, D. T. 1986. Regulation of the absorption and release of nitrate by plant cells: a review of current ideas and methodology. In: Lambers, H., Neeteson, J., Stulen, I., (Eds.), *Physiological, ecological and applied aspects of nitrogen metabolism in higher plants*. Nijhoff, M., Dordrecht, pp. 3-27.
- Clarkson, D. T. 1998. Mechanisms for N-uptake and their running costs; is there scope for more efficiency? In: Lambers, H., Poorter, H., Van Vuuren, M. M. I., (Eds), *Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences*. Backhuys Publishers, Leiden, pp. 221-235.
- Clarkson, D. T., Lüttge, U. 1991. Mineral nutrition: inducible and repressible nutrient transport systems. In: Behnke, H. D., Essev, K., Kubitzki, K., Runge, M., Ziegler, H., (Eds), *Progress in botany*. Vol. 52. Springer Verlag Berlin, pp. 61-83.
- Clarkson, D. T., Touraine, B. 1994. Morphological responses of plants to nitrate-deprivation: a role for abscisic acid? In: Roy, J., Garnier, E., (Eds), *A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*. SPB Academic Publishing, The Hague, pp 187-196.
- Clarkson, D. T., Sanderson, J., Russell, R. S. 1968. Ion uptake and root age. *Nature* 220, 805-806.
- Clarkson, D. T., Carvajal, M., Henzler, T., Waterhouse, R. N., Smyth, A. J., Cooke, D. T., Steudle, E. 2000. Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *J. Exp. Bot.* 51, 61-70.
- Clement, C. R., Hopper, M. J., Jones, L. H. P. 1978a. The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution. I. Effect of  $\text{NO}_3^-$  concentration. *J. Exp. Bot.* 29, 453-464.
- Clement, C. R., Hopper, M. J., Jones, L. H. P., Leaf, E. I. 1978b. The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution. II. Effect of light, defoliation and relationship of  $\text{CO}_2$  flux. *J. Exp. Bot.* 29, 1173-1183.
- Colmer, T. D., Bloom, A. J. 1998. A comparison of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  net fluxes along roots of rice and maize. *Plant, Cell Environ.* 21, 240-246.
- Cooper, H. D., Clarkson, D. T. 1989. Cycling of amino nitrogen and other nutrients between shoot and roots in cereals as possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *J. Exp. Bot.* 40, 753-762.

- Cowan, I. R., Raven, J. A., Hartung, W., Farquhar, G. D. 1982. A possible role for abscisic acid in coupling stomatal conductance and photosynthetic carbon metabolism in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 9, 489-498.
- Cramer, M. D., Savidov, N. A., Lips, S. H. 1996. The influence of enriched rhizosphere CO<sub>2</sub> on N uptake and metabolism in wild-type and NR-deficient barley plants. *Physiol. Plant.* 97, 47-54.
- Cram, W. J. 1973. Internal factors regulating nitrate and chloride influx in plant cells. *J. Exp. Bot.* 24, 328-341.
- Cram, W. J. 1983. Chloride accumulation as a homeostatic system: set points and perturbations. The physiological significance of influx isotherms, temperature effects and the influence of plant growth substances. *J. Exp. Bot.* 34, 1484-1502.
- Crawford, N. M. 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7, 859-868.
- Crawford, N. M., Glass, A. D. M. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci.* 3, 389-395.
- Daniel-Vedel, F., Filleur, S., Caboche, M. 1998. Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 235-239.
- Davies, D. D. 1973. Control of and by pH. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27, 513-429.
- Davies, D. D. 1986. The fine control of cytosolic pH. *Physiol. Plant.*, 67, 702-706.
- Davies, W. J., Zhang, J. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 55-76.
- Deane-Drummond, C. E. 1982. Mechanisms for nitrate uptake into barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Fergus) seedlings grown at controlled nitrate concentrations in the nutrient medium. *Plant Sci. Lett.* 24: 79-89.
- Deane-Drummond, C. E. 1984. The apparent induction of nitrate uptake by *Chara corallina* following pretreatment with or without nitrate and chlorate. *J. Exp. Bot.*, 35, 1182-1193.
- Deane-Drummond, C. E. 1985. Regulation of nitrate uptake into *Chara corallina* cells via NH<sub>4</sub><sup>+</sup> stimulation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> efflux. *Plant Cell Environ.* 8, 105-110.
- Deane-Drummond, C. E. 1986. Nitrate uptake into *Pisum sativum* L. cv. Feltham First seedlings: commonality with nitrate uptake into *Chara corallina* and *Hordeum vulgare* through a substrate- cycling model. *Plant Cell Environ.* 9, 41-8.
- Deane-Drummond, C. E., Glass, A. D. M. 1982. Nitrate uptake into barley (*Hordeum vulgare*) plants. A new approach using <sup>36</sup>ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> as an analog for NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. *Plant Physiol.* 70, 50-54.
- Deane-Drummond, C. E., Glass, A. D. M. 1983a. Short term studies of nitrate uptake into

- barley plants using ion specific electrodes and  $^{36}\text{ClO}_3^-$ . I Control of net uptake by nitrate efflux. *Plant Physiol.* 73, 100-104.
- Deane-Drummond, C. E., Glass, A. D. M. 1983b. Short term studies of nitrate uptake into barley plants using ion specific electrodes and  $^{36}\text{ClO}_3^-$ . II Regulation of  $\text{NO}_3^-$  efflux by  $\text{NH}_4^+$ . *Plant Physiol.* 73, 105-110.
- de la Haba, P., Agüera, E., Maldonado, J. M. 1990. Differential effects of ammonium and tungsten on nitrate and nitrite uptake and reduction by sunflower plants. *Plant Sci.* 70, 21-26.
- Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., Passama, L. 1995a. Diurnal regulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake in soybean plants. I. changes in  $\text{NO}_3^-$  influx, efflux, and N utilization in the plant during the day/night cycle. *J. Exp. Bot.* 46, 1585-1594.
- Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., Passama, L. 1995b. Diurnal regulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake in soybean plants. II. Relationship with accumulation of  $\text{NO}_3^-$  and asparagine in the roots. *J. Exp. Bot.* 46, 1595-1602.
- Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., Passama, L. 1996a. Diurnal regulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake in soybean plants. III. Implication of the Dijkshoorn-Ben Zioni model in relation with the diurnal changes in  $\text{NO}_3^-$  assimilation. *J. Exp. Bot.* 47, 885-892.
- Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., Passama, L. 1996b. Diurnal regulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake in soybean plants. IV. Dependence on current photosynthesis and sugar availability to the roots. *J. Exp. Bot.* 47, 893-900.
- Deng, M. D., Moureaux, T., Leydecker, M. T., Caboche, M. 1990. Nitrate-reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. *Planta* 180, 281-5.
- Deng, M. D., Moureaux, T., Chérel, I., Boutin, J.-P., Caboche, M. 1991. Effects of nitrogen metabolites on the regulation and circadian expression of tobacco nitrate reductase. *Plant Physiol. Biochem.* 29, 239-247.
- Devienne, F., Mary, B., Lamaze, T. 1994. Nitrate transport in intact wheat roots. II. Long term effects of  $\text{NO}_3^-$  concentration in the nutrient solution on  $\text{NO}_3^-$  unidirectional fluxes and distribution within the tissues. *J. Exp. Bot.* 45, 677-684.
- Devienne-Barret, F., Juste, E., Machets, J. M., Mary, B. 2000. Integrated control of nitrate uptake by crop growth rate and soil nitrate availability under field conditions. *Ann. Bot.* 86, 995-1005.
- Doddema, H., Telkamp, G. P. 1979. uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*,

- disturbed in uptake or reduction of nitrate. II Kinetics. *Physiol. Plant.* 45, 332-338.
- Douglas, P., Morrice, N., MacKintosh, C. 1995. Identification of a regulatory phosphorylation site in the hinge 1 region of nitrate reductase from spinach (*Spinacea oleracea*) leaves. *FEBS Lett.* 37, 113-117.
- Drew, M. C., Saker, L. R. 1984. Uptake and long-distance transport of phosphate, potassium and chloride in relation to internal ion concentration in barley: evidence of non-allosteric regulation. *Planta* 160, 500-507.
- Edouards, J. H., Barber, S. A. 1976. Nitrogen flux into corn roots as influenced by shoot requirement. *Agron. J.* 68, 461-473.
- Ehdaie, B., Reza Shakiba, M., Waines, J. G. 1999. Path analysis of genotype x environment interactions of wheats to nitrogen. *Agronomie* 19, 45-56.
- Else, M. A. 1996. Xylem-borne messages in the regulation of shoot responses to soil flooding. PhD thesis. Lancaster University, UK.
- Faure, J.-D., Meyer, C., Caboche, M. 1997. Assimilation du nitrate: nitrate et nitrite réductases. In: Morot-Gaudry, J.-F., (Ed.), *Assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique, biochimique et moléculaire*. INRA, Paris, pp. 45-65.
- Faure, J.-D., Vincentz, M., Kronenberger, J., Caboche, M. 1991. Co-regulated expression of nitrate and nitrite reductases. *Plant J.* 1, 107-113.
- Ferrario-Méry S., Murchie, E., Hirel, B., Galtier, N., Quick, W. P., Foyer, C. H. 1997. Manipulation of the pathways of sucrose biosynthesis and nitrogen assimilation in transformed plants to improve photosynthesis and productivity. In: Foyer, C. H., Quick, W. P., (Eds), *A molecular approach to primary metabolism in higher plants*. London: Taylor & Francis 125-153.
- Fiscus, E. L. 1981. Effects of abscisic acid on the hydraulic conductance and the total ion transport through *Phaseolus* root systems. *Plant Physiol.* 68, 169-174.
- Frachisse, J.-M., Colcombet, J., Guern, J., Barbier-Brygoo, H. 2000. Characterization of a nitrate-permeable channel able to mediate sustained anion efflux in hypocotyl cells from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 21, 361-371.
- Gao, Z. F., Lips, S. H. 1997. Effects of increasing inorganic carbon supply to roots on net nitrate uptake and assimilation in tomato. *Physiol. Plant.* 101, 206-212.
- Gastal, F., Saugier, B. 1989. Relationships between nitrogen uptake and carbon assimilation in whole plants of tall fescue. *Plant Cell Environ.* 12, 407-418.
- Geßler, A., Schultze, M., Schrempp, S., Rennenberg, H. 1998. Interaction of pholem-translocated amino compounds with nitrate net uptake by the roots of beech (*Fagus*

- sylatica*) seedlings. J. Exp. Bot. 49, 1529-1537.
- Glass, A. D. M. 1988. Nitrogen uptake by plant roots. ISI Atlas of Science, Animal and Plant Sciences 151-156.
- Glass, A. D. M. 1989. Plant nutrition. An introduction to current concepts. Boston/Portola Valley: Jones and Bartlett.
- Glass, A. D. M., Siddiqi, M. Y. 1985. Nitrate inhibition of chloride influx in barley: implications for a proposed chloride homeostat. J. Exp. Bot. 36, 556-566.
- Glass, A. D. M., Siddiqi, M. Y. 1995. Nitrogen absorption by plant roots. In: Srivastava, H. S., Singh, R. P., (Eds), Nitrogen nutrition in higher plants. Associated Publishing Co, New Delhi, pp. 21-56.
- Glass, A. D. M., Shaff, J. E., Kochian, L. V. 1992. Studies of the uptake of nitrate in barley. Plant Physiol. 99, 456-463.
- Glass, A. D. M., Thomson, R. G., Bordeleau, L. 1985. Regulation of  $\text{NO}_3^-$  influx in barley. Studies using  $^{13}\text{NO}_3^-$ . Plant Physiol. 77, 379-381.
- Gojon, A., Bussi, C., Grignon, C., Salsac, L. 1991. Distribution of  $\text{NO}_3^-$  reduction between roots and shoots of peach tree seedlings as affected by  $\text{NO}_3^-$  uptake rate. Physiol. Plant. 82, 505-512.
- Gossett, D. R., Millhollon, E. P., Cran Lucas, M. 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. Crop Sci. 34, 706-714.
- Goyal, S. S., Huffaker, R. C. 1986. A novel approach and a fully automated microcomputer-based system to study kinetics of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , and  $\text{NH}_4^+$  transport simultaneously by intact wheat seedlings. Plant Cell Environ. 9, 209-215.
- Grignon, C., Thibaud, J.-B., Lamaze, T. 1997. Transport du nitrate par la racine. In: Morot-Gaudry, J.-F., (Ed.), Assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique, biochimique et moléculaire. INRA, Paris, pp. 27-43.
- Hänisch-Ten-Cate, C. H., Breteler, H. 1981. Role of sugars in nitrate utilization by roots of dwarf bean. Plant Physiol. 52, 129-135.
- Hansen, G. K. 1980. Diurnal variation of root respiration rates and nitrate uptake as influenced by nitrogen supply. Physiol. Plant. 48, 421-427.
- Hartmann, T. 1979. Metabolism of organic N-compounds. Ammonium assimilation and amino acid metabolism. Progr. Bot. 41, 83-92.
- Hartung, W., Radin J. W. 1989. Absciscic acid in the mesophyll apoplast and in the root xylem sap of water-stressed plants: the significance of pH gradients. Curr. Top Plant Biochem.

- Physiol. 8, 110-124.
- Heber, U., Wagner, U., Kaiser, W., Neimanis, S., Bailey, K., Walker, D. 1994. Fast cytoplasmic pH regulation in acid-stressed leaves. *Plant Cell Physiol.* 35, 479-488.
- Higgins, D. R., Cregg, J. M. 1998. *Pichia* protocols. Humana Press, Totowa, N. J.
- Hill-Cottingham, D. G., Lloyd-Jones, C. P. 1979. Translocation of nitrogenous compounds in plants. In: Hewitt, E. J., Cutting, C. V., (Eds), Nitrogen assimilation of plants. Proceedings of The Long Ashton Symposium 19-22 Sept. 1977.
- Hole, D. J., Emran, A. M., Fares, Y., Drew, M. 1990. Induction of nitrate transport in maize roots and kinetics of influx measured with nitrogen-13. *Plant Physiol.* 93, 642-647.
- Hoffmann, B., Kosegarten, H. 1995. FITC-dextran for measuring apoplast pH and apoplastic pH gradients between various cell types in sunflower leaves. *Physiol Plant* 95, 327-335.
- Hoff, T., Truong, H.-N., Caboche, M. 1994. The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant Cell Environ.* 17, 489-506.
- Huang N.-C., Chiang, C.-S., Crawford, N. M., Tsay, Y.-F. 1996. CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis* and shows cell type-specific expression in roots. *Plant Cell* 8, 2183-2191.
- Huang N.-C., Liu, K., Lo, H., Tsay, Y.-F. 1999. Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* 11, 1381-1392.
- Huber, S. C., Bachmann, M., Huber, J. 1996. Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for  $\text{Ca}^{2+}$  and 14-3-3 proteins. *Trends Plant Sci.* 12, 433-438.
- Huffaker, R. C., Rains, D. W. 1978. Factors influencing nitrate acquisition by plants: assimilation and fate of reduced nitrogen. In: Nielsen, D. R., McDonald, J. O., (Eds), Nitrogen in the environment. Vol. 2. London, pp. 1-43.
- Huppe, H. C., Turpin, D. H. 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 577-607.
- Ibarlucea, J. M., Llama, M. J., Serra, J. L., Marcarula, M. J. 1983. Mixed-transfer kinetics of nitrite uptake in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Miranda) seedlings. *Plant Sci. Lett.* 29, 339-347.
- Imsande, J., Touraine, B. 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiol.* 105, 3-7.
- Jackson, W. A. 1978. Critical of factors influencing nitrate acquisition by plant: assimilation and fate of reduced nitrogen. Nitrate acquisition and assimilation by higher plants: process in the root system. In: Nielsen, D. R., McDonald, J. G., (Eds), Nitrogen in the environment.

- Vol. 2. Soil-plant relationships. Academic Press, New York USA, pp. 45-88.
- Jackson, W. A., Volk, R. J. 1981. Nitrate transport processes and compartmentation in root systems. In: Lyons, J. M., Valentine, R. C., Philips, D. A., Rains, D. W., Huffaker, R. C., (Eds), Genetic engineering of symbiotic nitrogen fixation and conservation of fixed nitrogen. Plenum Press, New York, pp. 517-532.
- Jackson, W. A., Flesher, D., Hageman, R. H. 1973. Nitrate uptake by dark-grown corn seedlings. *Plant Physiol.* 51, 120-127.
- Jackson, W. A., Kwik, K. D., Volk, R. J. 1976a. Nitrate uptake during recovery from nitrogen deficiency. *Physiol. Plant.* 36, 174-181.
- Jackson, W. A., Kwik, K. D., Volk, R. J., Butz, R. G. 1976b. Nitrate influx and efflux by intact wheat seedlings: effect of prior nitrogen nutrition. *Planta* 132, 149-156.
- Jackson, W. A., Pan, W. L., Moll, R. H., Kamprath, E. J. 1986a. Uptake, translocation and reduction of nitrate. In: Neyra, C. A., (Ed.), Biochemical basis of plant breeding. Vol. 2. Nitrogen metabolism. Boca Raton, CRC Press, pp. 1-39.
- Jackson, W. A., Volk, R. J., Morgan, M. A., Pan, W. L., Teyler, R. H. 1986b. Nitrogen uptake and partitioning by roots. In: Shannon, J. C., Knievel, D. P., Boyes, C. D., (Eds), Regulation of carbon and nitrogen reduction and utilization in maize. American Society of Plant Physiology, pp. 83-104.
- Jarvis, S. C., MacDuff, J. H. 1989. Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. I. Recovery of uptake and growth and their interactions. *J. Exp. Bot.* 40, 965-975.
- Jeschke, W. D., Pate, J. S. 1991. Cation and chloride partitioning through xylem and phloem within the whole plant of *Ricinus communis* L. under conditions of salt stress. *J. Exp. Bot.* 42, 1105-1116.
- Johannes, E., Crofts, A., Sanders, D. 1998. Control of  $\text{Cl}^-$  efflux in *Chara corallina* by cytosolic pH, free  $\text{Ca}^{2+}$ , and phosphorylation indicates a role of plasma membrane anion channels in cytosolic pH regulation. *Plant Physiol.* 118, 173-181.
- Joy, K. W. 1988. Ammonia, glutamine and asparagines: a carbon-nitrogen interface. *Can. J. Bot.* 6, 2103-2109.
- Joy, K. W., Blackwell, R. D., Lea, P. J. 1992. Assimilation of nitrogen in mutants lacking enzymes of the glutamate synthase cycle. *J. Exp. Bot.* 43, 139-145.
- Justes, E. 1993. Diagnostic de la nutrition azotée du blé à partir de la teneur en nitrate de la base de la tige. Application au raisonnement de la fertilisation. Thèse de Doctorat, INA P-G, 227p.

- Justes, E., Mary, B., Meynard, J.-M., Machet, J.-M., Thelier-Huches, L. 1994. Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Ann. Bot.* 74, 397-407.
- Kaiser, W. M., Brendle-Behnisch, E. 1991. Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. I. Modulation in vivo by CO<sub>2</sub> availability. *Plant Physiol.* 96, 363-367.
- Kaiser, W. M., Huber, S. C. 1997. Correlation between apparent activation state of nitrate reductase (NR), NR hysteresis and degradation of NR protein. *J. Exp. Bot.* 48, 1367-1374.
- Kaiser, W. M., Spill, D. 1991. Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. II. In vitro modulation by ATP and AMP. *Plant Physiol.* 96, 368-375.
- Kaiser, W. M., Weiner, H., Huber, S. C. 1999. Nitrate reductase in higher plants: a case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity *Physiol. Plant* 105, 385-390.
- Kandlbinder, A., Weiner, H., Kaiser, W. M. 2000. Nitrate reductases from leaves of *Ricinus* (*Ricinus communis* L.) and spinach (*Spinacia oleracea* L.) have different regulatory properties. *J. Exp. Bot.* 51, 1099-1105.
- Karrou, M. 1996. Variation génotypique de l'efficacité d'utilisation de l'azote chez le blé tendre. *AL Awamia* 95, 39-51.
- Karrou, M. 1992. Physiological and morphological traits associated with nitrogen uptake and use in Moroccan wheats at different moisture regimes. Ph. D. Diss. University of Nebraska Lincoln. Lincoln USA.
- Keller, C. P., Van Volkenburgh, E. 1998. Evidence that auxin-induced growth of tobacco leaf tissues does not involve cell wall acidification. *Plant Physiol.* 118, 557-564.
- Keltjens, W. G., Nieuwenhaus, J. W., Nelms, J. A. 1986. Nitrogen retranslocation in plants of maize, lupin and clovebur. *Plant Soil* 91, 323-327.
- Key, A. J., Bird, I. F., Cornelius, M. J., Lea, P. J., Wallsgrove, R. M., Mifflin, B. J. 1978. Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* 275, 741-743.
- Key, J. L. 1966. Effect of purine and pyrimidine analogues on growth and RNA metabolism in soybean hypocotyls. The selective action of 5-fluorouracil. *Plant Physiol.* 41, 1257-1264.
- King, B. J., Siddiqi, M. Y., Ruth, T. J., Warner, R. L., Glass, A. D. M. 1993. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. *Plant Physiol.* 102, 1279-1286.
- Kirkby, E. A., Armstrong, M. J. 1980. Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate assimilation in shoot of castor oil plants. *Plant Physiol.* 65, 286-290.



- Kleiner, D., 1981. The transport of  $\text{NH}_3$  and  $\text{NH}_4^+$  across biological membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 639, 41-52.
- Klein, D., Morcuende, R., Stitt, M., Krapp, A. 2000. Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and nitrogen metabolism is completely overridden when sugars fall below a critical level. *Plant Cell Environ.* 23, 863-871.
- Kleinhofs, A., Warner, R. L. 1990. Advances in nitrate assimilation. In: Mifflin, B.J., Lea, P. J., (Eds), *The Biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Intermediary nitrogen metabolism*. Vol.16. Academic Press, pp. 89-120.
- Kojima, M., Wu, S. J., Fukui, H., Sugimoto, T., Nanmori, T., Oji, Y. 1995. Phosphorylation/dephosphorylation of Komatsuna (*Brassica campestris*) leaf nitrate reductase in vivo and in vitro in response to environmental light conditions: effects of protein kinase and protein phosphatase inhibitors. *Physiol Plant* 93, 139-145.
- Koncalova, H. 1990. Anatomical adaptations to waterlogging in roots of wetland graminoids: limitations and drawbacks. *Aquatic Bot.* 38, 127-134.
- Kronzucker, H. J., Glass, A. D. M., Siddiqi, M. Y. 1999a. Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley. Analysis of component fluxes. *Plant Physiol.* 120, 283-291.
- Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M. 1995. Compartmentation and flux characteristics of nitrate in spruce. *Planta* 196, 674-682.
- Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., Kirk, G. J. D. 1999b. Nitrate-Ammonium synergism in rice. A subcellular flux analysis. *Plant Physiol.* 119, 1041-1045.
- LaBrie, S. T., Crawford, M. N. 1994. A glycine to aspartic acid change in the MoCo domain of nitrate reductase reduced both activity and phosphorylation levels in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 269, 14497-14501.
- Lainé, P., Ourry, A., Boucaud, J. 1995. Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L.: effects of localized nitrate supply. *Planta* 196, 77-83.
- Lambers, H., Simpson, R. J., Beilharz, V. C., Dalling, M. J. 1982. Growth and translocation of C and N in wheat (*Triticum aestivum*) grown with a split root system. *Physiol. Plant.* 56, 421-429.
- Langendorfer, R. L., Watters, M., Smarelli, J. J. R. 1988. Metabolite control of squash nitrate reduction. *Plant Sci.* 57, 119-125.
- Lappartient, A. G., Vidmar, J. J., Leustek, T., Glass, A. D. M., Touraine, B. 1999. Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *Plant J.* 18, 89-95.
- Larson, C. M. 1992. Translocation of nitrogen in osmotically stressed wheat seedlings. *Plant*

- Cell Environ. 15, 447-453.
- Larson, C. M., Larson, M., Purves, J. V., Clarkson, D. T. 1991. Translocation and cycling through roots of recently absorbed nitrogen and sulfur in wheat (*Triticum aestivum*) during vegetative and generative growth. *Physiol. Plant* 82, 345-352.
- Latzko, E., Kelly, G. J. 1983. The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub> plants. *Physiol. Vég.* 21, 805-815.
- Lauter, F.-R., Ninnemann, O., Bucher, M., Riesmeier, J. W., Frommer, W. B. 1996. preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8139-8144.
- Lazof, D. B., Rufty, T. W., Redinbaugh, M. G. 1992. Localization of nitrate absorption and translocation within morphological regions of the corn root. *Plant Physiol.* 100, 1251-1258.
- Lea, P. J., Mifflin, B. J. 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plant. *Nature* 251, 614-616.
- Le Bot, J., Kirkby, E. A. 1992. Diurnal uptake of nitrate and potassium during the vegetative growth of tomato plants. *J. Plant Nutr.* 15, 247-264.
- Lee, R. B. 1982. Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency. *Ann. Bot.* 50, 429-449.
- Lee, R. B. 1993. Control of net uptake of nutrients by regulation of influx in barley plants recovering from nutrient deficiency. *Ann. Bot.* 72, 223-230.
- Lee, R. B., Clarkson, D. T. 1986. Nitrogen-13 studies of nitrate fluxes in barley roots. I. Compartmental analysis from measurements of <sup>13</sup>N efflux. *J. Exp. Bot.* 37, 1753-1767.
- Lee, R. B., Drew, M. C. 1986. Nitrogen-13 studies of nitrate fluxed in barley roots. II. Effect of plant N-status on the kinetic parameters of nitrate influx. *J. Exp. Bot.* 37, 1768-1779.
- Lee, R. B., Drew, M. C. 1989. Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. *J. Exp. Bot.* 40, 741-752.
- Lee, R. B., Rudge, K. A. 1986. Effects of nitrogen deficiency on the absorption of nitrate and ammonium by barley plants. *Ann. Bot.* 57, 471-486.
- Lee, R. B., Purves, J. V., Ratcliff, R. G., Saker, L. R. 1992. Nitrogen assimilation and the control of ammonium and nitrate absorption by maize roots. *J. Exp. Bot.* 43, 1385-1396.
- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Domingo Olive, F., Filleur, S., Daniel-Vedele, F., Gojon, A. 1999. Molecular and functional regulation of two NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant J.* 18, 509-519.
- Lejay, L., Quillere, I., Roux, Y., Tillard, P., Cliquet, J.-B., Meyer, C., Morot-Gaudry, J.-F., Gojon, A. 1997. Abolition of post-transcriptional regulation of nitrate reductase partially

- prevents the decrease in leaf  $\text{NO}_3^-$  reduction when photosynthesis is inhibited by  $\text{CO}_2$  deprivation, but not in darkness. *Plant Physiol.* 115, 623-630.
- Lemaire, G., Salette, J. 1984. Relation entre dynamique de croissance et dynamique de prélèvement d'azote pour un peuplement de graminées fourragères. I. Etude de l'effet du milieu. *Agronomie* 4, 423-430.
- Lew, R. R., Spanswick, R. M. 1985. Characterization of anion effects on the nitrate sensitive ATP-dependent proton pumping activity of soybean (*Glycine max* L.) seedling root microsomes. *Plant Physiol.* 77, 352-357.
- Lillo, C. 1994. Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol. Plant.* 90, 616-620.
- Lillo, C., Ruoff, P. 1992. Hysteric behaviour of nitrate reductase. Evidence of an allosteric binding site for reduced pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 19, 13456-13459.
- Lillo, C., Provan, F., Appenroth, K.-J. 1998. Photoreceptors involved in the regulation of nitrate reductase in *Spirodela polyrhiza*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 44, 205-210.
- Lillo, C., Kazazaic, S., Ruoff, P., Meyer, C. 1997. Characterization of nitrate reductase from light- and dark-exposed leaves: comparison of different species and effects of 14-3-3 inhibitor proteins. *Plant Physiol.* 114, 1377-1383.
- Lillo, C., Smith, L. H., Nimmo, H. G., Wilkins, M. B. 1996. Regulation of nitrate reductase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities in barley leaf protoplast. *Planta* 200, 181-185.
- Lim, J. T., Wilkerson, G. G., Raper, C. D., Gold, H. J. 1990. A dynamic model of vegetative soybean plants: model structure and behaviour under varying root temperature and nitrogen concentration. *J. Exp. Bot.* 41, 221-241.
- Limami, M. A., Améziane, R. 1997. Nutrition azotée ( $\text{NO}_3^-$ ) et distribution du carbone dans la plante. In: Morot-Gaudry, J.-F., (Ed.), *Assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique, biochimique et moléculaire*. INRA, Paris, pp. 249-259.
- Lin, C.-M., Koh, S., Stacey, G., Yu, S.-M., Lin, T.-Y., Tsay, Y.-F. 2000. Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, OsNRT1, from rice. *Plant Physiol.* 122, 379-388.
- Lin, W., Kauer, J. C. 1985. Peptide alcohols as promoters of nitrate and ammonium ion uptake in plants. *Plant Physiol.* 77, 403-406.
- Liu, K.-H., Huang, C.-Y., Tsay, Y.-F. 1999. CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* 11, 865-874.
- Li, X.-Z., Oaks, A. 1993. Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays*. Influence

- of  $\text{NO}_3^-$ . *Plant Physiol.* 102, 1251-1257.
- Li, X.-Z., Larson, D. E., Glibetic, M., Oaks, A. 1995. Effect of glutamine on the induction of nitrate reductase. *Physiol. Plant* 93, 740-744.
- Lu, J.-L., Ertl, J. R., Chen, C.-M. 1992. Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. *Plant Physiol.* 98, 1255-1260.
- MacDuff, J. H., Jackson, S. B. 1992. Influx and efflux of nitrate and ammonium in Italian ryegrass and white clover roots: comparisons between effects of darkness and defoliation. *J. Exp. Bot.* 43, 525-535.
- MacDuff, J. H., Wild, A. 1988. Changes in  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{K}^+$  uptake by four species in flowing solution culture in response to increased irradiance. *Physiol. Plant.* 74, 251-256.
- MacDuff, J. H., Jarvis, S. C., Mosquera, A. 1989. Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. *J. Exp. Bot.* 40, 977-984.
- MacDuff, J. H., Jarvis, S. C., Cockburn, J. E. 1994. Acclimation of  $\text{NO}_3^-$  fluxes to low root temperature by *Brassica napus* in relation to  $\text{NO}_3^-$  supply. *J. Exp. Bot.* 45, 1045-1056.
- Mäck, G., Tischner, R. 1994. Constitutive and inducible net  $\text{NH}_4^+$  uptake of barley seedlings. *Plant Physiol.* 144, 351-357.
- MacKintosh, C. 1992. regulation of spinach leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1137, 121-126.
- MacKintosh, C., Douglas, P., Lillo, C. 1995. Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant Physiol.* 107, 451-457.
- MacKown, C. T., Jackson, W. A., Volk, R. J. 1982a. Restricted nitrate influx and reduction in corn seedlings exposed to ammonium. *Plant Physiol.* 69, 353-359.
- MacKown, C. T., Jackson, W. A., Volk, R. J. 1982b. Nitrate assimilation by decapitated corn root systems: effect of ammonium during induction. *Plant Sci. Lett.* 24, 295-302.
- MacKown, C. T., Jackson, W. A., Volk, R. J. 1983. Partitioning of previously-accumulated nitrate to translocation, reduction, and efflux in corn roots. *Planta* 157, 8-14.
- MacKown, C. T., Volk, R. J., Jackson, W. A. 1981. Nitrate accumulation, assimilation and transport by decapitated corn roots. *Plant Physiol.* 68, 133-138.
- MacRobbie, E. A. C. 1979. Vacuoles: the framework. In: Reid, E., (Ed.), *Plant organelles*. Ellis Horwood, Chichester, UK, pp. 61-68.
- Maki, H., Yamagishi, K., Sato, T., Ogura, N., Nakagawa, H. 1986. Regulation of nitrate

- reductase activity in cultured spinach cells as studied by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Physiol.* 82, 739-741.
- Man, H.-M., Abd-El Baki, G. K., Stegmann, P., Weiner, H., Kaiser, W. M. 1999. The activation state of nitrate reductase is not always correlated with total nitrate reductase activity in leaves. *Planta* 209, 462-468.
- Martin, F., BenDriss Amraoui, M. 1986.  $^{15}\text{N}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful tool to study amino acid biosynthesis in higher plants. In: Lambers, H., Neeteson, J. J., Stulen, I., (Eds), *Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants*. Martinus Nijhoff Publishers, pp. 191-195.
- Martin, F., BenDriss Amraoui, M. 1989. Partitioning of assimilated nitrogen in beech (*Fagus sylvatica* L.) *Ann. Sci. For.* 46, 160-162.
- Martinoia, E., Rentsch, D. 1994. Malate compartmentation – responses to a complex metabolism. *Annu. Re. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 447-467.
- Martinoia, E., Schramm, M. J., Kaiser, G., Kaiser, W. M., Heber, U. 1986. Transport of anions in isolated barley vacuoles. I. Permeability to anions and evidence for a  $\text{Cl}^-$  uptake system. *Plant Physiol.* 80, 895-901.
- Martin, Ph., Meynard, J.-M. 1997. Systèmes de culture, érosion et pollution des eaux par l'ion nitrate. In: Riou, C., Bonhomme, R., Chassin, P., Neveu, A., Papy, F., (Eds), *L'eau dans l'espace rural, production végétale et qualité de l'eau*. INRA, Paris, pp. 303-322.
- Mary, B., Guérif, J. 1994. Les modèles de prévision de l'évolution des matières organiques et de l'azote dans le sol. *Cah. Agricultures* 3, 247-257.
- Matt, P., Geiger, M., Walch-Liu, P., Engels, C., Krapp, A., Stitt, M. 2001. The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. *Plant Cell Environ.* 24, 177-190.
- Mattson, M., Johansson, E., Lundborg, T., Larsson, M., Larsson, C. M. 1991. Nitrogen utilization in N-limited barley during vegetative and generative growth. I. Growth and nitrate uptake kinetics in vegetative cultures grown at different relative addition rates of nitrate-N. *J. Exp. Bot.* 42, 197-205.
- McClure, P. R., Kochian, L. V., Spanswick, R. M., Shaff, J. E. 1990. Evidence for cotransporter of nitrate and protons in maize roots. *Plant Physiol.* 93, 281-289.
- McNaughton, G. S., Presland, M. R. 1983. Whole plant studies using radioactive  $^{13}\text{N}$ -nitrogen. 1. Techniques for measuring nitrate and ammonium ion uptake and transport in

- hydroponically grown *Zea mays*. J. Exp. Bot. 34, 880-892.
- Melzer, J. M., Kleinhofs, A., Warner, R. L. 1989. Nitrate reductase regulation: effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. Mol. Gen. Genet. 217, 341-346.
- Merlo, L., Ferreti, M., Passera, C., Ghisi, R. 1995. Light modulation of nitrate reductase activity in leaves and roots of maize. Physiol. Plant 94, 305-311.
- Mertens, J. A., Shiraishi, N., Campbell, W. H. 2000. Recombinant expression of Molybdenum reductase fragments of plant nitrate reductase at high levels in *Pichia pastoris*. Plant physiol. 123, 743-756.
- Meynard, J.-M. 1985. Les besoins en azote du blé d'hiver jusqu'au début de la montaison. Agronomie 5, 579-589.
- Mifflin, B. J., Lea, P. J. 1977. Amino acid metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. 28, 299-329.
- Mifflin, B. J., Lea, P. J. 1980. Ammonia assimilation. In: Mifflin, B., (Ed.), Amino acids and derivatives. The biochemistry of plants. Vol. 5. Academic Press, New York, pp. 169-202.
- Miller, A. J., Smith, S. J. 1992. The mechanism of nitrate transport across the tonoplast of barley root cells. Planta 187, 554-557.
- Miller, A. J., Smith, S. J. 1996. Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. J. Exp. Bot. 47, 843-854.
- Minotti, P. L., Jackson, W. A. 1970. Nitrate reductase in the roots and shoots of wheat seedlings. Planta 95, 36-44.
- Minotti, P. L., Williams, D. C., Jackson, W. A. 1968. Nitrate uptake and reduction as affected by calcium and potassium. Soil Sci. Amer. Proc. 32, 692-698.
- Minotti, P. L., Williams, D. C., Jackson, W. A. 1969. Nitrate uptake by wheat as influenced by ammonium and other cations. Crop Sci. 9, 9-14.
- M'sehli, D. 1999. Impact de l'irrigation de complément par les eaux usées épurées par infiltration-percolation sur une culture de blé dur (*Triticum durum*) variété Karim. Tesi Master of Science n° 189, CIHEAM, Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari.
- Morgan, A. A., Jackson, W. A., Volk, R. J. 1985. Concentration dependence of the nitrate assimilation pathway in maize roots. Plant Sci. 38, 185-191.
- Morgan, A. A., Volk, R. J., Jackson, W. A. 1973. Simultaneous influx and efflux of nitrate during uptake by perennial rye-grass. Plant Physiology 51, 267-272.
- Moorhead, G., Douglas, P., Morrice, N., Scarabel, M., Aitken, A., MacKintosh, C. 1996. Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. Curr. Biol. 6, 1104-1113.
- Mossaddaq, F. 1990. Nitrogen assimilation and remobilisation in relation to grain yield and

- protein in spring wheats. Ph. D. thesis. Colorado state University, Fort Collins, Colorado.
- Muller, B., Touraine, B. 1992. Inhibition of  $\text{NO}_3^-$  uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. *J. Exp. Bot.* 43, 617-623.
- Muller, B., Tillard, P., Touraine, B. 1995. Nitrate fluxes in soybean seedling roots and their response to amino acids: an approach using  $^{15}\text{N}$ . *Plant Cell Environ.* 18, 1267-1279.
- Müller, C., Scheible, W.-R., Stitt, M., Krapp, A. 2001. Influence of malate and 2-oxoglutarate on the NIA transcript level and nitrate reductase activity in tobacco leaves. *Plant Cell Environ.* 24, 191-203.
- Naik, M. S., Nicholas, D. J. D. 1986. Malate metabolism and its relation to nitrate assimilation in plants. *Phytochem.* 25, 571-576.
- Neyra, C. A., Hageman, R. H. 1975. Nitrate uptake and induction of nitrate reductase in excised corn roots. *Plant Physiol.* 56, 692-695.
- Neyra, C. A., Hageman, R. H. 1976. Relationships between carbon dioxide, malate and nitrate accumulation and reduction in corn (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 58, 726-730.
- Nissen, P., Nissen, O. 1983. Validity of the multiphasic concept of ion absorption in plants. *Physiol. Plant.* 57, 47-56.
- Nussaume, L., Vincentz, M., Meyer, C., Boutin, J.-P., Caboche, M. 1995. Post-transcriptional regulation of nitrate reductase by light is abolished by an N-terminal deletion. *Plant Cell* 7, 611-621.
- Oaks, A., Gadal, P. 1979. Nitrate utilization in cells of higher plants. In: Verlag, G. F., Elsevier/North Holland Biomedical Press, (Eds), *Cell compartmentation and metabolic channeling*.
- Ogawa, K., Shiraishi, N., Ida, S., Nakagawa, H., Komamine, A. 1999. Effects of glutamine on the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in cultured spinach cells. *J. Plant Physiol.* 154, 46-50.
- Ogawa, K., Soutome, R., Hiroyama, K., Hagio, T., Ida, S., Nakagawa, H., Komamine, A. 2000. Co-regulation of nitrate reductase and nitrite reductase in cultured spinach cells. *J. Plant Physiol.* 157, 299-306.
- Olmos, E., Hernandez, J. A., Sevilla, F., Hellin, E. 1994. Induction of several antioxidant enzymes in the selection of salt tolerant cell line of *Pisum sativum*. *J. Plant Physiol.* 144, 594-598.
- Oparka, K. J., Davies, H. V., Prior, D. A. M. 1987. The influence of applied nitrogen on export and partitioning of current assimilate by field-grown potato plants. *Ann. Bot.* 59, 311-323.

- Oscarson, P., Larsson, C. M. 1986. Relations between uptake and utilization of  $\text{NO}_3^-$  in *Pisum* growing exponentially under nitrogen limitation. *Physiol. Plant.* 67, 109-117.
- Oscarson, P., Ingemarsson, B., Af Ugglas, M., Larsson, C. M. 1987. Short-term studies of  $\text{NO}_3^-$  uptake in *Pisum* using  $^{13}\text{NO}_3^-$ . *Planta* 170, 550-555.
- Ourry, A., MacDuff, J., Prudhomme, M., Boucaud, J. 1996. Diurnal variation in the simultaneous uptake and 'sink' allocation of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  by *Lolium perenne* in flowing solution culture. *J. Exp. Bot.* 47, 1853-1863.
- Padgett, P., Leonard, R. 1996. Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 47, 871-883.
- Pearson, C. J., Steer, B. T. 1977. Daily changes in nitrate uptake and metabolism in *Capiscum annuum*. *Planta* 137, 102-112.
- Pearson, C. J., Volk, R. J., Jackson, W. A. 1981. Daily changes in nitrate influx, efflux and metabolism in maize and pearl millet. *Planta* 152, 319-324.
- Peuke, A. D., Jeschke, W. D. 1999. The characterization of inhibition of net nitrate uptake by salt in salt-tolerant barley (*Hordeum vulgare* L. cv. California Mariout). *J. Exp. Bot.* 50, 1365-1372.
- Peuke, A. D., Kaiser, W. M. 1996. Nitrate or ammonium uptake and transport, and rapid regulation of nitrate reduction in higher plants. *Prog. Bot.* 57, 93-113.
- Peuke, A. D., Glaab, J., Kaiser, W. M., Jeschke, W. D. 1996. The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. IV. Flow and metabolism of inorganic nitrogen and malate depending on nitrogen nutrition and salt treatment. *J. Exp. Bot.* 47, 377-385.
- Pigaglio, E., Durant, N., Meyer, C. 1999. A conserved acidic motif in the N-terminal domain of nitrate reductase is necessary for the inactivation of the enzyme in the dark by phosphorylation and 14-3-3 binding. *Plant Physiol.* 119, 219-229.
- Pinton, R., Cesco, S., Iacoletti, G., Astolfi, S., Varanini, Z. 1999. Modulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase. *Plant Soil* 215, 155-161.
- Pitman, M. G. 1988. Whole plants, In: Baker, D. A., Hall, J. L., (Eds), *Solute transport in plant cells and tissues*. Longman Scientific and Technical, Harlow, pp. 346-391.
- Polley, H. W., Johnson, H. B., Mayeux, H. S. 1995. Nitrogen and water requirements of C3 plants grown at glacial to present carbon dioxide concentrations. *Funct. Ecol.* 9, 86-96.
- Polley, H. W., Johnson, H. B., Tischler, C. R., Torbert, H. A. 1999. Links between transpiration and plant nitrogen: variation with atmospheric  $\text{CO}_2$  concentration and nitrogen



- availability. *Int. J. Plant Sci.* 160, 535-542.
- Pollock, C. J., Cairns, A. J. 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 77-101.
- Poole, R. J. 1978. Energy coupling for membrane transport. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29, 437-460.
- Poorter, H., Van der Werf, A., Atkins, O. K., Lambers, H. 1991. Respiratory energy requirements of roots vary with the potential growth rate of a plant species. *Physiol. Plant.* 83, 469-475.
- Popp, M., Summons, R. E. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase and amino acid metabolism in roots. *Physiol. Vég.* 21, 1083-1089.
- Pouliquin, P., Boyer, J.-C., Grouzis, J.-P., Gibrat, R. 2000. Passive nitrate transport by root plasma membrane vesicles exhibits an acidic optimal pH like the H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.* 122, 265-274.
- Powlson, D. S., Pruden, G., Johnston, M. E., Jenkinson, D. S. 1986. The nitrogen cycle in the broadbalk wheat experiment: recovery and losses of <sup>15</sup>N-labelled fertilizer applied in spring and inputs of nitrogen from the atmosphere. *J. Agric. Sci. Camb.* 107, 591-609.
- Provan, F., Lillo, C. 1999. Photosynthetic post-translational activation of nitrate reductase. *J. Plant Physiol.* 154, 605-609.
- Provan, F., Aksland, L.-M., Meyer, C., Lillo, C. 2000. Deletion of the nitrate reductase N-terminal domain still allows binding of 14-3-3 proteins but affects their inhibitory properties. *Plant Physiol.* 123, 757-764.
- Radin, J. W., Matthews, M. A. 1989. Water transport properties of cortical cells in roots of nitrogen and phosphorus-deficient cotton seedlings. *Plant Physiol.* 89, 264-268.
- Rao, K. P., Rains, D. W. 1976. Nitrate absorption by barley. I. Kinetics and energetics. *Plant Physiol.* 57, 55-58.
- Raper, C. D., Osmond, D. L., Wann, M., Weeks, W. W. 1978. Interdependence of root and shoot activity in determining nitrogen uptake rate of roots. *Bt. Gaz.* 139, 289-294.
- Raven, J. A. 1977. H<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> in phloem and symplast: relation of relative immobility of the ions to the cytoplasmic nature of the transport paths. *New Phytol* 79, 465-480.
- Raven, J. A. 1985. pH regulation in plants. *Sci. Pro.* 69, 495-509.
- Raven, J. A., Smith, F. A. 1976. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.* 76, 415-431.
- Recous, S., Nicolardot, B., Simon, J.-C. 1997. Le cycle de l'azote dans les sols et la qualité

- des eaux souterraines. In: Riou, C., Bonhomme, R., Chassin, P., Neveu, A., Papy, F., (Eds), *L'eau dans l'espace rural, production végétale et qualité de l'eau*. INRA, Paris, pp. 193-215.
- Redinbaugh, M. G., Campbell, W. H. 1985. Quaternary structure and composition of squash NADH: nitrate reductase. *J. Biol. Chem.* 260, 3380-3385.
- Rieger, M., Litvin, P. 1999. Root system hydraulic conductivity in species with contrasting root anatomy. *J. Exp. Bot.* 50, 201-209.
- Richardson, P. T., Backer, D. A., Ho, L. C. 1982. The chemical composition of cucurbit vascular exudates. *J. Exp. Bot.* 33, 1239-1247.
- Robinson, D. 1986. Limits to nutrient inflow rates in roots and root systems. *Plant physiol.* 68, 551-559.
- Rodgers, C. O., Barneix, A. J. 1988. Cultivar differences in the rate of nitrate uptake by intact wheat plants as related to growth rate. *Physiol. Plant.* 72, 121-126.
- Rodgers, C. O., Barneix, A. J. 1989. The effect of N deprivation on nitrate uptake and growth rate of two wheat cultivars selected for different fertility levels. *Plant Physiol. Biochem.* 27, 387-392.
- Rochat, C. 1997. Transport des acides aminés dans la plante. In: Morot-Gaudry, J.-F., (Ed.), *Assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique, biochimique et moléculaire*. INRA, Paris, pp. 221-234.
- Rouzé, P., Caboche, M. 1992. Nitrate reduction in higher plants: molecular approaches to function and regulation. In: Wray, J. L., (Ed.), *Inducible plant proteins: their biochemistry and molecular biology*. Cambridge University Press.
- Rufty, T. W., Mackown, C. T., Volk, R. J. 1989. Effects of altered carbohydrate availability on whole-plant assimilation of  $^{15}\text{NO}_3^-$ . *Plant Physiol.* 89, 457-463.
- Rufty, T. W., Raper, C. D., Huber, S. C. 1984. Alterations in internal partitioning of carbon in soybean plants in response to nitrogen stress. *Can. J. Bot.*, 62, 501-508.
- Rufty, T. W., Thomas, J. F., Remmler, J. L., Campbell, W. H., Volk, R. J. 1986. Intercellular localization of nitrate reductase in roots. *Plant Physiol.* 82, 675-680.
- Rufty, T. W., Volk, R. J., McClure, P. R., Israel, D. W., Raper, C. D. 1982. Relative content of  $\text{NO}_3^-$  and reduced N in xylem exudates as an indicator of root reduction of concurrently absorbed  $^{15}\text{NO}_3^-$ . *Plant Physiol.* 69, 166-170.
- Ruiz-Cristin, J., Briskin, D. P. 1991. Characterization of  $\text{H}^+/\text{NO}_3^-$  symport associated with plasma membrane vesicles of maize roots using  $^{36}\text{ClO}_3^-$  as a radiotracer analog. *Arch. Biochem. Biophys.* 285, 74-82.
- Ryan, J., Abdel Monem, M., El Mejahed, K. 1989. Nitrogen fertilization of Hessian fly-

- resistant "Saada" wheat in a shallow soil of semi-arid Morocco. *Rachis* 8, 23-26.
- Ryan, J., El Gharous, M., Nsarellah, N. 1994. Nitrogen application timing for dryland Moroccan cereals. *AL Awamia* 85, 15-23.
- Sacchi, G. A., Abruzzese, A., Lucchini, G., Fiorani, F., Cocucci, S. 2000. Efflux and active re-absorption of glucose in roots of cotton plants grown under saline conditions. *Plant Soil* 220, 1-11.
- Saier, M. H. 1994. Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleanings evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58, 71-93.
- Sanders, D., Miller, A. J., Blackford, S., Brosnan, J. M., Johannes, E. 1990. Cytosolic free calcium homeostasis in plants. *Curr. Top. Plant Biochem.* 9, 20-37.
- Santi, S., Locci, G., Pinton, R., Cesco, S., Varanini, Z. 1995. Plasma membrane  $H^+$ -ATPase in maize roots induced for  $NO_3^-$  uptake. *Plant Physiol.* 109, 1277-1283.
- Scaife, A. 1988. Derivation of critical nutrient concentrations for growth rate from data from field experiment. *Plant Soil* 109, 159-169.
- Scaife, A. 1989. A pump/leak buffer model for plant nitrate uptake. *Plant Soil* 114, 139-141.
- Scaife, A., Schloemer, S. 1994. The diurnal pattern of uptake and reduction by spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Ann. Bot.* 73, 337-343.
- Scheible, W. R., Gonz  les-Fontes, A., Morcuende, R., Lauerer, M., Geiger, M., Glaab, J., Gojon, A., Schule, E. D., Stitt, M. 1997. Tobacco mutants with a decreased number of functional *nir* genes compensate by modifying the diurnal regulation of transcription, post-translational modification and turnover of nitrate reductase. *Planta* 203, 304-319.
- Scheurwater, I., Clarkson, D. T., Purves, J. V., van Rijt, G., Saker, L. R., Welschen, R., Lambers, H. 1999. Relatively large nitrate efflux can account for the high specific respiratory costs for nitrate transport in slow-growing grass species. *Plant Soil* 215, 123-134.
- Schmidt, C., Schroeder, J. I. 1994. Anion selectivity of slow anion channels in the plasma membrane of guard cells. Large nitrate permeability. *Plant Physiol.* 106, 383-391.
- Schmidt, C., Schelle, I., Liao, Y.-J., Schroeder, J. I. 1995. Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9535-9539.
- Schulze, E.-D., Kelliher, F. M., Körner, C., Lloyd, J., Leuning, R. 1994. Relationships among maximum stomatal conductance, eco-system surface conductance, carbon assimilation rate,

- and plant nitrogen nutrition: a global ecology scaling exercise. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25, 629-660.
- Schumaker, K. S., Sze, H. 1987. Decrease of pH gradients in tonoplast vesicles by  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$ : evidence for a  $\text{H}^+$ -coupled anion transport. *Plant Physiol.* 83, 490-496.
- Sebillotte, M., Meynard, J.-M. 1990. Systèmes de culture, systèmes d'élevage et pollutions azotées. In: Calvet (Ed.), *Nitrates, agriculture, eau*. INRA, Paris, pp. 289-312.
- Sechley, K. A., Yamaya, T., Oaks, A. 1992. Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. *Int. Rev. Cyt.* 134, 85-163.
- Sharma, A. K., Sopory, S. K. 1984. Independent effects of phytochrome and nitrate on nitrate reductase and nitrite reductase activities in maize. *Photochem. Photobiol.* 39, 491-493.
- Shiraishi, N., Campbell, W. H. 1997. Expression of nitrate reductase FAD-containing fragments in *Pichia*. In: Stevenson, K. J., Massey, V., Williams, C. H., (Eds), *Flavins and flavoproteins*, 1996. University of Calgary Press, Calgary, Canada, pp. 931-934.
- Shiraishi, N., Croy, C., Campbell, W. H. 1998. Engineering of pyridine nucleotide specificity of nitrate reductase: mutagenesis of recombinant cytochrome b reductase fragment of *Neurospora crassa* NADPH: nitrate reductase. *Arch Biochem. Biophys* 335, 104-115.
- Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M. 1982. Simultaneous consideration of tissue and substrate potassium concentration in  $\text{K}^+$  uptake Kinetics: a model. *Plant Physiol.* 69, 283-285.
- Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., Ruth, T. J. 1991. Studies of the uptake of nitrate in barley. III. Compartmentation of  $\text{NO}_3^-$ . *J. Exp. Bot.* 42, 1455-1463.
- Siddiqi, M. Y., King, B. J., Glass, A. D. M. 1992. Effects of nitrite, chlorate, and chloride on nitrate uptake and nitrate reductase activity. *Plant Physiol.* 100, 644-650.
- Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., Ruth, T. J., Fernando, M. 1989. Studies on the regulation of nitrate influx by barley seedlings using  $^{13}\text{NO}_3^-$ . *Plant Physiol.* 90, 806-813.
- Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., Ruth, T. J., Rufty, T. W. 1990. Studies of the uptake of nitrate in barley. *Plant Physiol.* 93, 1426-1432.
- Siebrecht, S., Tischner, R. 1999. Changes in the xylem exudate composition of poplar (*P. tremula* x *P. alba*)-dependent on the nitrogen and potassium supply. *J. Exp. Bot.* 50, 1797-1806.
- Siebrecht, S., Mack, G., Tischner, R. 1995. Function and contribution of the root tip in the induction of  $\text{NO}_3^-$  uptake along the barley root axis. *J. Exp. Bot.* 46, 1669-1676.
- Silk, W. K., Erickson, R. O. 1980. Local biosynthesis rates of cytoplasmic constituents in growing tissue. *J. Theor. Biol.* 83, 701-703.
- Simpson, R. J., Lambers, H., Dalling, M. J. 1982a. Translocation of nitrogen in a vegetative

- wheat plant (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.* 56, 11-17.
- Simpson, R. J., Lambers, H., Dalling, M. J. 1982b. Kinetin application to roots and its effect on uptake, translocation and distribution of nitrogen in wheat (*Triticum aestivum*) grown with a split root system. *Physiol. Plant.* 56, 430-435.
- Simpson, R. J., Lambers, H., Dalling, M. J. 1983. Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.). IV. Development of a quantitative model of the translocation of nitrogen to the grain. *Plant Physiol.* 71, 7-14.
- Sivasankar, S., Rothstein, S., Oaks, A. 1997. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. *Plant Physiol.* 114, 583-589.
- Smith, F. A. 1973. The internal control of nitrate uptake into excised barley roots with differing salt contents. *New Phytol.* 72, 767-782.
- Solomonson, L. P., Barber, M. J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 225-253.
- Staswick, P. E., Huang, J. F., Rhee, Y. 1991. Nitrogen and methyl jasmonate induction of soybean vegetative storage protein genes. *Plant Physiol.* 96, 130-136.
- Stitt, M. 1999. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 178-186.
- Stitt, M., Steup, M. 1985. Starch and sucrose degradation. In: Douce, R., Day, D., (Eds), *Higher plant respiration*. Springer verlag, Berlin, pp. 347-390.
- Stöhr, C., 1999. Relationship of nitrate supply with growth rate, plasma membrane-bound and cytosolic nitrate reductase, and tissue nitrate content in tobacco plants. *Plant Cell Environ.* 22, 169-177.
- Su, W., Huber, S. C., Crawford, N. M. 1996. Identification in vitro of a post-translational regulatory site in the hinge 1 region of *Arabidopsis* nitrate reductase. *Plant Cell* 8, 511-527.
- Su, W., Mertens, J. A., Kanamaru, K., Campbell, W. H., Crawford, N. M. 1997. Analysis of wild-type and mutant plant nitrate reductase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Plant Physiol.* 115, 1135-1143.
- Swaider, J. M., Chyan, Y., Splittstoesser, W. E. 1991. Genotypic differences in nitrogen uptake, dry matter production and nitrogen distribution in pumpkins (*Cucurbita moschata* Poir). *J. Plant Nutr.* 14, 511-524.
- Talouizte, A., Moyse, A., Champigny, M. L. 1989. Bases physiologiques de la nutrition nitrique des végétaux supérieurs. I. Absorption de  $\text{NO}_3^-$ . *Ann. Biol.* 28, 233-254.
- Talouizte, A., Moyse, A., Champigny, M. L. 1990. Bases physiologiques de la nutrition nitrique des végétaux supérieurs. II. Contrôle de l'absorption des ions nitriques. *Ann. Biol.*

- 29, 217-234.
- Talouizte, A., Champigny, M. L., Bismuth, E., Moyse, A. 1984a. Root carbohydrate metabolism associated with nitrate assimilation in wheat previously deprived of nitrogen. *Physiol. Vég.* 22, 19-27.
- Talouizte, A., Bismuth, E., Ouhmidou, B., Moyse, A., Champigny, M. L. 1986. Root endogenous carbohydrate and nitrate utilization by wheat seedlings. *Life Sci. Adv. (Plant Physiol.)* 5, 74-79.
- Talouizte, A., Guiraud, G., Moyse, A., Marol, C., Champigny, M. L. 1984b. Effect of previous nitrate deprivation on  $^{15}\text{N}$ -nitrate absorption and assimilation by wheat seedlings. *J. Plant Physiol.* 116, 113-122.
- Terry, B. R., Tyerman, S. D., Findlay, G. P. 1991. Ion channels in the plasma membrane of *Amaranthus* protoplasts: one cation and one anion channel dominate the conductance. *J. Membr. Biol.* 121, 223-236.
- Ter Steege, M. W. 1996. Regulation of nitrate uptake in a whole plant perspective. Thesis. University of Groningen, The Netherlands.
- Ter Steege, M. W., Stulen, I., Wiersema, P. K., Posthumus, F., Vaalburg, W. 1999. Efficiency of nitrate uptake in spinach: impact of external nitrate concentration and relative growth rate on nitrate influx and efflux. *Plant Soil* 208, 125-134.
- Ter Steege, M. W., Stulen, I., Wiersema, P. K., Paans, A. J. M., Vaalburg, W., Kuiper, P. J. C., Clarkson, D. T. 1998. Growth requirement for N as a criterion to assess the effects of physical manipulation on nitrate uptake fluxes in spinach. *Physiol. Plant.* 103, 181-192.
- Teyker, R. H., Jackson, W. A., Volk, R. J., Moll, R. H. 1988. Exogenous  $^{15}\text{NO}_3^-$  influx and endogenous  $^{14}\text{NO}_3^-$  efflux by two maize (*Zea mays* L.) inbreds during nitrogen deprivation. *Plant Physiol.* 86, 778-781.
- Thibaud, J. B., Grignon, C. 1981. Mechanism of nitrate uptake in corn roots. *Plant Sci.* 22, 279-289.
- Tompkins, G. A., Jackson, W. A., Volk, R. J. 1978. Accelerated nitrate uptake in wheat seedlings: effects of ammonium and nitrite pretreatments and of 6-methylpurine and puromycin. *Physiol. Plant.* 43, 166-171.
- Touraine, B., Gojon, A. 1997. Intégration de l'absorption du nitrate dans la plante. In: Morot-Gaudry, J.-F., (Ed.), *Assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique, biochimique et moléculaire*. INRA, Paris, pp. 109-128.
- Touraine, B., Clarkson, D. T., Muller, B. 1994. Regulation of nitrate uptake at the whole plant

- level. In: Roy, J., Garnier, E., (Eds.), A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions. SPB Academic Publishing, La Haye, pp. 11-30.
- Touraine, B., Grignon, N., Grignon, C. 1988. Charge balance in  $\text{NO}_3^-$ -fed soybean. Estimation of  $\text{K}^+$  and carboxylate recirculation. *Plant Physiol.* 88, 605-612.
- Touraine, B., Muller, B., Grignon, C. 1992. Effect of phloem-translocated malate on  $\text{NO}_3^-$  uptake by roots of intact soybean plants. *Plant Physiol.* 99, 1118-1123.
- Triboi-Blondel, A. M. 1979. Dynamique comparée de l'absorption des nitrates et de l'eau par des plantules de blé. *Comp. Rend. Acad. Sci., Paris, série D* 288, 1545-1548.
- Triplett, E. W., Barnett, N. M., Blevins, D. G. 1980. Organic acids and ion balance in xylem exudates of wheat during nitrate and sulfate absorption. *Plant Physiol.* 65, 610-613.
- Tsay, Y.-F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. A., Crawford, N. M. 1993. The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate inducible nitrate transporter. *Cell* 72, 705-713.
- Tyerman, S. D., Findlay, G. P. 1989. Current-voltage curves of single  $\text{Cl}^-$  channels which coexist with two types of  $\text{K}^+$  channel in the tonoplast of *Chara corallina*. *J. Exp. Bot.* 40, 105-117.
- Tyerman, S. D., Findlay, G. P., Paterson, G. J. 1986. Inward membrane current in *Chara inflata*. II. Effects of pH,  $\text{Cl}^-$ -channel blockers and  $\text{NH}_4^+$ , and significance for the hyperpolarized state. *J. Membr. Biol.* 89, 153-161.
- Ullrich, C. I., Novacky, A. J. 1990. Extra-and intracellular pH and membrane potential changes induced by  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , and  $\text{NO}_3^-$  uptake and fusicoccin in root hairs of *Limnobium stoloniferu*. *Plant Physiol.* 94, 1561-1567.
- Ullrich, W. R., Guern, J. 1990. Ions flux and pH changes induced by trans-plasmalemma electron transfer and fusicoccin in *Lemna gibba* L. (strain G1). *Planta* 180, 390-399.
- Ullrich, W. R., Novacky, A. J. 1981. Nitrate-dependent membrane potential changes and their induction in *Lemna gibba* G1. *Plant Sci. Lett.* 22, 211-217.
- Ullrich, W. R., Larson, M., Larson, C.-M., Lesch, S., Novacky, A. 1984. Ammonium uptake in *Lemna giba* G1, related membrane potential changes, and inhibition of anion uptake. *Physiol. Plant.* 61, 369-376.
- Van der Leij, M., Smith, S. J., Miller, A. J. 1998. Remobilisation of vacuolar stored nitrate in barley root cells. *Planta* 205, 64-72.
- Van der Werf, A., Welschen, R., Lambers, H. 1992. Respiratory losses increase with decreasing inherent growth rate of a species and with decreasing nitrate supply: a search for explanations for these observations. In: Lambers, H., Van der Plas, L. H. W., (Eds),

- Molecular, biochemical and physiological aspects of plant respiration. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, pp. 421-433.
- Van Quy, L., Champigny, M. L. 1992.  $\text{NO}_3^-$  enhances the kinase activity for phosphorylation of phosphoenol pyruvate carboxylase and sucrose phosphate synthase proteins in wheat leaves. *Plant Physiol.* 99, 344-347.
- Van Quy, L., Lamaze, T., Champigny, M. L. 1991. Short-term effects of nitrate on sucrose synthesis in wheat leaves. *Planta* 185, 53-57.
- Vessey, J. K., Raper, C. D., Henry, L. T. 1990. Cyclic variations in nitrogen uptake rate in soybean plants: uptake during reproductive growth. *J. Exp. Bot.* 41, 1579-1584.
- Vidmar, J. J., Zhuo, D. M. Y., Siddiqi, M. Y., Schjoerring, J. K., Touraine, B., Glass, A. D. M. 2000. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiol. (Bethesda)* 123, 307-318.
- Vincentz, M., Caboche, M. 1991. Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *EMBO J.* 10, 1027-1035.
- Vincentz, M., Moureaux, T., Leydecker, M.-T., Vaucheret, H., Caboche, M. 1993. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J.* 3, 315-324.
- Vouillot, M. O., Huet, P., Boissard, P. 1998. Early detection of N deficiency in a wheat crop using physiological and radiometric methods. *Agronomie* 18, 117-130.
- Vunkova-Radeva, R., Yaneva, I. A. 1997. Frost tolerance of winter wheat plants grown on acidic soil. *Russ. J. Plant Physiol.* 44, 607-613.
- Vuorinen, A. H., Kaiser, W. M. 1997. Dark  $\text{CO}_2$  fixation by roots of willow and barley in media with high level of inorganic carbon. *J. Plant Physiol.* 151, 405-408.
- Walker, N. A., Zhang, W.-H., Harrington, G., Holdaway, N., Patrick, J. W. 2000. Effluxes of solutes from developing seed coats of *Phaseolus vulgaris* L. and *Vicia faba* L.: locating the effect of turgor in a coupled chemiosmotic system. *J. Exp. Bot.* 51, 1047-1055.
- Wanek, W., Popp, M. 2000. Effects of rhizospheric bicarbonate on net nitrate uptake and partitioning between the main nitrate utilising processes in *Populus canescens* and *Sambucus nigra*. *Plant Soil* 221, 13-24.
- Wang, M. Y., Glass, A. D. M., Shaff, J. E., Kochian, L. V. 1994. Ammonium uptake by rice Roots. III. *Plant Physiol.* 104, 899-906.
- Wang, M. Y., Siddiqi, M. Y., Ruth, J. J., Glass, A. D. M. 1993. Ammonium uptake by rice roots. II. *Plant Physiol.* 103, 1259-1267.
- Wang, R., Crawford, N. M. 1996. Genetic identification of a gene involved in constitutive



- high-affinity nitrate transport in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9297-9301.
- Wang, R., Liu, D., Crawford, N. M. 1998. The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15134-15139.
- Warner, R. L., Huffaker, R. C. 1989. Nitrate transport is independent of NADH and NAD(P)H nitrate reductases in barley seedlings. *Plant Physiol.* 91, 947-953.
- Weiner, H., Kaiser, W. M. 1999. 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves. *FEBS Lett.* 455, 75-78.
- Wild, A., Jones, L. H. P., MacDuff, J. H. 1987. Uptake of mineral nutrients and crop growth: the use of flowing nutrient solutions. *Advan. Agron.* 41, 171-219.
- Wilkinson, S., Davies, W. J. 1997. Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiol* 113, 559-573.
- Wilkinson, S., Corlett, J. E., Oger, L., Davies, W. J. 1998. Effects of xylem pH on transpiration from wild-type and flacca tomato leaves. *Plant Physiol.* 117, 703-709.
- Wirén, N., Gazzarrini, S., Frommer, W. B. 1997. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant Soil* 196, 191-199.
- Xiangjia Min, M. Y., Siddiqi, M. Y., Guy, R. D., Glass, A. D. M. Kronzucker, H. J. 2000. A comparative kinetic analysis of nitrate and ammonium influx in two early-successional tree species of temperate and boreal forest ecosystems. *Plant Cell Environ.* 23, 321-328.
- Yaneva, I. A., Baydanova, V. D., Vunkova-Radeva, R. V. 2000. Nitrate reductase activation state in leaves of molybdenum-deficient winter wheat. *J. Plant Physiol.* 157, 495-501.
- Yaneva, I. A., Mäck, G., Vunkova-Radeva, R., Tischner, R. 1996. Changes in nitrate reductase activity and the protective effect of molybdenum during cold stress in winter wheat grown on acid soil. *J. Plant Physiol.* 149, 211-216.
- Zhang, H., Forde, B. G. 2000. Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.* 51, 51-59.
- Zhou, J.-J., Theodoulou, F. L., Muldin, I., Ingemarsson, B., Miller, A. J. 1998. Cloning and functional characterization of *Brassica napus* transporter that is able to transport nitrate and histidine. *J. Biol. Chem.* 273, 12017-12023.
- Zhuo, D., Okamoto, M., Vidmar, J. J., Glass, A. D. M. 1999. Regulation of putative high-affinity nitrate transporter (Nr2;1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 17, 563-568.