

## La teneur en proline et la résistance des plantes aux sels

W. DREIER

Section Biologie de l'Université Humboldt de Berlin,  
Département de Biochimie\*

### The Content of Proline and the Salt Resistance of Plants

**Abstract.** Application of sodium chloride to crop plants in the culture medium leads to an increase in their endogenous content of free proline. There is a certain concentration of sodium chloride above which the proline content of the plants strongly rises (critical point). A relationship between endogenous sodium and proline contents could be found. In salt-sensitive plants (wheat) the critical point lies below that of salt-tolerant plants (barley). The critical concentration is not changed by certain alterations of the culture medium. The determination of the critical point by means of measurement of the proline concentration served as a basis for the analysis of the salt tolerance of crop plants.

Le problème de la salinité du sol étant souvent le facteur limitatif joue un rôle important dans le cadre de l'agriculture parce que presque toutes les plantes cultivées sont peu résistantes ou peu tolérantes aux sels à cause de fait que la résistance du cytoplasme des plantes est normalement basse (FLOWERS 1972, HALL et FLOWERS 1973). La cellule peut éliminer les différences de potentiel hydrique entre le tissu végétal et le milieu par accumulation des ions ou des substances organiques monomoléculaires (HSIAO *et al.* 1976, GÖRING *et al.* 1977, WYN JONES *et al.* 1977). Ce sont des substances telles que la proline, quelques sucres, la glycérine, le mannite et l'isofloridoside p. ex. Évidemment, la proline joue un rôle particulier dans le cadre de l'osmorégulation dont l'augmentation de la teneur est une conséquence très caractéristique d'une salinité élevée (STEWART et LEE 1974, TREICHEL 1975, CHU *et al.* 1976). Il est possible, d'après les résultats obtenus, que le proline soit compartimentée dans le cytoplasme (GÖRING *et al.* 1977).

À cause de la relation entre la résistance de la plante et sa teneur en proline, on a choisi cette relation comme principe d'un test de sélection des plantes à l'égard du gel (PAQUIN 1977) et de la sécheresse (SINGH *et al.* 1972). Mais les résultats les plus récents, de même que ceux de l'auteur, démontrent qu'il n'existe pas de relation directe entre la teneur absolue en proline et la résistance aux sels (PAQUIN 1977, SCHOBERT 1977). En utilisant le com-

Réçu le 18 décembre 1981; accepté le 27 mai 1982

\* Adresse: 1040 Berlin, Invalidenstr. 43, R.D.A.

portement des plantes à des concentrations différentes en sel, l'auteur a tenté d'élaborer un test de résistance à partir de la teneur en proline afin de sélectionner des cultivars de céréales tolérantes aux sels.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les recherches ont porté sur le comportement de 18 espèces et cultivars différentes de céréales: *Triticum durum* L. cv. Sakha; cv. Hedba; cv. Oued Zenati (toutes les cultivars d'origine algérienne); et cv. Dzafari (d'origine iranienne); *Triticum aestivum* L. cv. algérienne locale I et II, cv. Hatri et cv. Mironovskaja; *Triticum spelta*; *Triticum dicoccon*; *Triticum boeoticum*; *Aegilops squarrosa*; *Hordeum vulgare* cv. Trumpf et algérienne locale I et II; *Secale cereale* cv. Petka; *Avena sativa* algérienne locale; *Zea mays*.

#### Conditions de la mise en culture

Les graines ont été trempées pendant 4 h. Les graines furent transférées sur une culture hydroponique non tamponnée contenant les sels minéraux de White. Éclairage constant par tube de néon (OSRAM-L, Daylight 40 W/10Sa); distance tube-plante: 40 cm; aération constante; température: 20–22 °C. L'application des sels commença dans la phase de développement où la plante a atteint l'autotrophie et où les teneurs en proline se stabilisent (après le 7<sup>e</sup> jour).

#### Prélèvement des échantillons

D'une manière générale, le premier prélèvement a été effectué après le huitième jour et les prélèvements suivants tous les deux jours. Les échantillons (50–100 mg de manière fraîche (MF) pour le dosage de la proline, 500–1000 mg pour le dosage des ions) ont été prélevés sur la racine (5 mm à partir de l'apex), sur la tige (5 mm au-dessus de la graine) et sur la feuille (sommet du limbe, environ 1 cm), puis pesés et transférés à l'extraction.

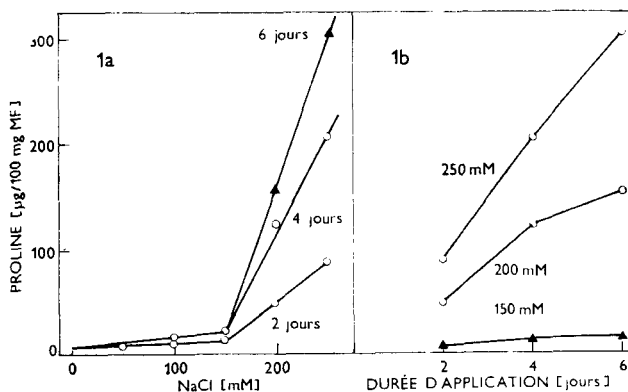


Fig. 1. La teneur en proline d'une tige de blé en fonction de la concentration en NaCl (1a) et de la durée d'application (1b) (*Triticum aestivum* cv. Hatri,  $n = 5$ ).

**Dosage de la proline**

L'extraction des échantillons prélevés a été effectuée par voie non-destructive (2 ml de méthanol 40%; 60 min d'extraction à une température de 85 °C dans un bain-marie).

Selon la teneur en proline 1 ml, 0,5 ml ou 0,25 ml ont été utilisés pour le dosage qui a été réalisé par une méthode colorimétrique modifiée d'après SINGH *et al.* (1972) sur la base de la ninhydrine dans un milieu acide.

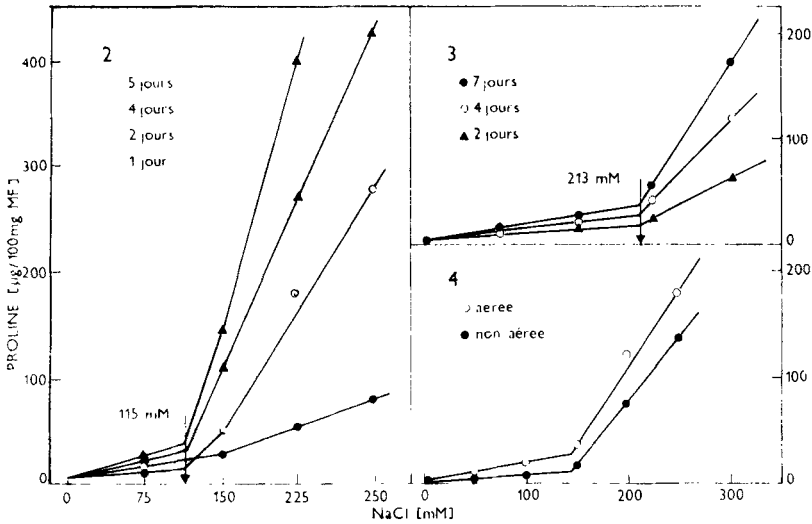


Fig. 2. La teneur en proline d'une tige de blé en dépendance de la concentration en NaCl et de la durée d'application (*Triticum aestivum*, alg. I, n = 5).

Fig. 3. Teneur en proline d'une tige en dépendance de la concentration en NaCl et de la durée d'application (*Hordeum vulgare*, alg. I, n = 5).

Fig. 4. Influence d'une aération sur la localisation du point critique (*Triticum aestivum* cv. Hatri; durée d'application 2 jours; n = 5).

**Dosage du potassium et du sodium**

Les ions ont été dosés après destruction humide des échantillons par l'acide chlorhydrique concentré.

Détermination du sodium et du potassium par photomètre à flamme (Eppendorf).

**RÉSULTATS**

**La teneur en proline des plantes cultivées dans des conditions de salinité**

Après l'application des sels, la teneur en proline augmente suivant la concentration en NaCl et la sensibilité de la plante. L'observation la plus intéressante est qu'il existe une concentration au-dessus de laquelle la formation de proline augmente très fortement (figure 1). Selon son caractère sensible ou tolérant, la plante absorbe plus ou moins de Na<sup>+</sup>. L'augmentation de la teneur en proline est causée par cette absorption variable en ions. Déjà à une

TABLEAU 1

La teneur en proline en relation avec de la substance osmotique perméable ou imperméable (maïs, racine,  $n = 5$ )

Substance	conc. [mM]	teneur en proline après 1 jour	[ $\mu\text{g g}^{-1}$ m.fr.] après 2 jours
sels minéraux d'après White	4,3	5,81	58,1
NaCl	150	16,65	166,5
KCl	150	28,45	284,5
glycérine	300	4,39	43,9
mannit	300	29,70	297,0
lactose	300	29,40	21,70
White (1 jour) après lactose (1 jour)			3,4

concentration de 115 mmol NaCl chez *Triticum aestivum* (alg. I), un point critique est atteint où la concentration en proline augmente considérablement (figure 2). Chez *Hordeum vulgare*, qui est une plante tolérante, la formation de la proline commence à une concentration de NaCl plus élevée (213 mmol) (figure 3). Ce comportement est particulièrement net sur la tige qui servira donc d'objet d'expérience.

Les substances imperméables d'une concentration isoosmotique par rapport aux ions (telles que mannit et lactose) provoquent aussi une augmentation de la proline. Au contraire, la glycérine étant une substance perméable, elle n'a aucun effet (tableau 1). Après transfert des plantes adaptées aux sels ou aux substances osmotiques actives dans des conditions normales (*i.e.* solution White), la proline accumulée est totalement reutilisée (tableau 1: White après lactose).

#### Influence d'une aération des racines

Chez les plantes aérées, la teneur en proline, en particulier celle de la racine, est toujours plus élevée que celle de la plante non aérée (tableau 2), mais le point critique ne varie pas pour le blé (figure 4) et pour le maïs bien que la teneur en proline, en potassium et en sodium soit plus élevée pour les plantes aérées.

#### La teneur en ions et la formation de la proline

La tige du blé (*Triticum aestivum* alg. I) contient une quantité de  $\text{Na}^+$  nettement plus grande que la tige de l'orge (figure 5 a, b), tandis que les

TABLEAU 2

L'influence de l'aération (1 et 2 jours) de la solution sur la teneur en proline (maïs, plantes non-aérées, teneur = 100%; conc. en sel de la solution: 150 mM;  $n = 3$ )

	1 jour		2 jours	
	racine [%]	tige [%]	racine [%]	tige [%]
témoin	250	154	220	99
NaCl	200	104	200	126
KCl	500	228	500	310

teneurs en ions des racines et des feuilles sont pratiquement identiques. La teneur en proline et son augmentation correspondent à cette teneur en sodium. Une recherche approfondie a démontré le net rapport entre les deux teneurs en ions ( $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ ) ainsi que la position des points critiques (mesurés par la teneur en proline) avec la concentration externe en NaCl (fi-

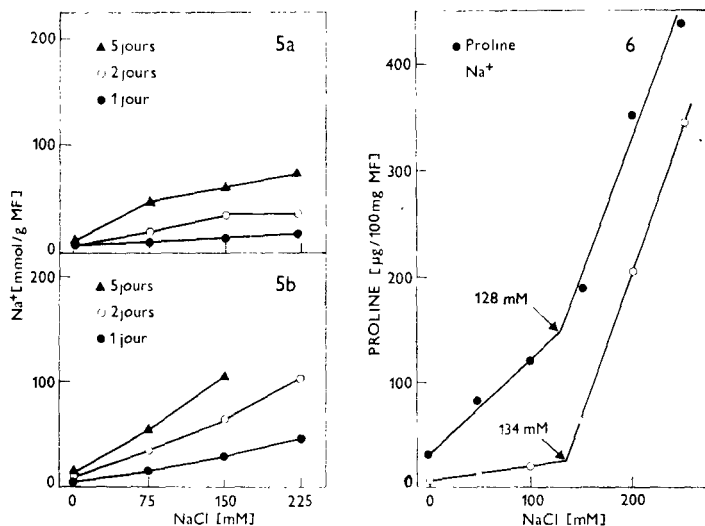


Fig. 5. Teneur endogène en sodium d'une tige en dépendance de la concentration en NaCl de la solution nutritive et de la durée d'application;  $n = 3$ . — a) *Hordeum vulgare*, alg. I; b) *Triticum aestivum*, alg. I.

Fig. 6. Teneur en proline et en sodium d'une tige en fonction de la concentration externe en NaCl et localisation des points critiques (*Triticum aestivum* cv. Mironovskaja, durée d'application 6 jours;  $n = 3$ ),

gure 6). La teneur en potassium reste constante pour la tige et la feuille des deux plantes choisies, elle diminue pour la racine. Chez l'orge, la teneur en  $\text{Na}^+$  ne dépasse pas la teneur en  $\text{K}^+$ , tandis que chez le blé, la teneur en  $\text{Na}^+$  est nettement supérieure à celle en  $\text{K}^+$ .

### DISCUSSION

La teneur en proline de la fraction des acides aminés libres dans les céréales traitées est relativement basse. Un déficit hydrique, sécheresse (BOGGES *et al.* 1976, HUBAC 1967, STEWART et BOGGES 1977), diminution du potentiel hydrique du milieu (substances osmotiques actives, MING SAI LIU et HELLEBUST 1976a, b) une chute de la température, gel, froid (PAQUIN 1977, TYANKOVA 1970) ou une température élevée (CHU *et al.* 1974), l'augmentation de la salinité (CHU *et al.* 1976, TREICHEL 1971) ainsi qu'un déficit en azote peuvent avoir pour conséquence une augmentation de cette teneur en proline, alors que les teneurs des autres acides aminés restent pratiquement constantes. Un taux élevé en sucre (MING SAI LIU et HELLEBUST 1976a), l'éclairage et l'aération augmentent la rapidité de sa formation at l'accumu-

lation. D'après nos résultats obtenus suivant les espèces sous l'action des sels, en particulier en comparant le blé et l'orge, on peut tirer la conclusion que la concentration absolue en proline à une concentration donnée en sel n'exprime pas directement le taux de résistance. La teneur en proline du blé, qui est une plante sensible, dépasse, à une certaine concentration, celle de l'orge. HUBAC (1967) et PAQUIN (1977) ont également tiré cette même conclusion pour le cas de la résistance à la sécheresse et du gel, où le taux élevé en proline est la conséquence de l'augmentation de la résistance et non la cause directe de l'endurcissement au gel ou de la résistance à la sécheresse. Cependant, la proline jouerait un rôle important dans l'augmentation de la résistance. Par action des sels appliqués, la teneur en proline du tissu augmente à une concentration en sel très typique pour chaque espèce (point critique). Jusqu'à cette concentration typique, la teneur en proline est relativement réduite même si la durée de l'application est prolongée (6 jours), et pour une concentration supérieure, on peut remarquer d'une façon générale une augmentation chez toutes les plantes. Après l'élimination de la diminution de l'écart de potentiel hydrique entre la cellule et le milieu ambiant, la teneur n'augmente plus et atteint très souvent un palier.

La figure 6 montre aussi les relations directes entre la formation de la proline et la teneur en  $\text{Na}^+$  par l'identité des deux points critiques en proline et en  $\text{Na}^+$ .

En utilisant les résultats des nos expériences, nous pouvons tirer la conclusion que les plantes tolérantes aux sels ont d'ordinaire une teneur plus faible en  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  après un stress de salinité que les plantes sensibles (HSIAO *et al.* 1976). Très souvent la teneur en  $\text{K}^+$  des plantes sensibles est-elle aussi plus faible. Au point critique, c-à-d, à une concentration élevée en sodium interne, l'apport incontrôlé de ses ions a des conséquences toxiques, en particulier dans le cas de l'absence de calcium (sélectivité de la pénétration), où les plantes meurent malgré leur comportement sensible ou tolérant. L'existence de points critiques différents selon les espèces investigées est une donnée importante. Ce point, indépendamment de la durée de l'application, de l'âge des plantes, de l'aération et d'autres conditions est très nettement identifiable et peut servir d'indicateur et, pour cette raison, de base à l'élaboration du test à cause de sa détermination facile et relativement précise. Plus la valeur du point critique est élevée, plus la résistance aux sels est élevée.

## RÉFÉRENCES

- BOGGES, S. F., ASPINALL, D., PALEG, L. G.: Stress metabolism. IX. The significance of end-product inhibition of proline biosynthesis and of compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. — *Aust. J. Plant Physiol.* 3 : 513–525, 1976.
- CHU, T. M., ASPINALL, D., PALEG, L. G.: Stress metabolism: VI. Temperature stress and the accumulation of proline in barley and radish. — *Aust. J. Plant Physiol.* 1 : 87–97, 1974.
- CHU, T. M., ASPINALL, D., PALEG, L. G.: Stress metabolism. VII. Salinity and proline accumulation in barley. — *Aust. J. Plant Physiol.* 3 : 219–228, 1976.
- FLOWERS, T. J.: Salt tolerance in *Suaeda maritima*. The effect of sodium chloride on growth, respiration and soluble enzymes in a cooperative study with *Pisum sativum*. — *J. exp. Bot.* 23 : 310–321, 1972.
- GÖRING, H., DREIER, W., HEINKE, F.: Zytoplasmatische Osmoregulation durch Prolin bei Wurzeln von *Zea mays*. — *Biol. Rundsch.* 15 : 377–380, 1977.
- HALL, J. L., FLOWERS, T. J.: The effect of salt on proline synthesis in the halophyte *Suaeda maritima*. — *Planta* 110 : 361–368, 1973.

- HELLEBUST, J. A.: Osmoregulation. — *Annu. Rev. Plant Physiol.* **27** : 485—505, 1976.
- HSIAO, T. C., ACEVEDO, E., FERRERES, E., HENDERSON, D. W.: Stress metabolism: water stress, growth, and osmotic adjustment. — *Phil. Trans. roy. Soc. London B* **273** : 479—500, 1976.
- HUBAC, C.: Accroissement chez les plantules de la résistance à la dessiccation par action préalable de la proline. — *Comp. rend. Acad. Sci. Paris* **264** : 1286—1289, 1967.
- MING SAI LIU, HELLEBUST, J. A.: Effects of salinity and osmolarity of the medium on amino-acid metabolism in *Cyclotella cryptica*. — *Can. J. Bot.* **54** : 938—948, 1976a.
- MING SAI LIU, HELLEBUST, J. A.: Regulation of proline metabolism in the marine diatom *Cyclotella*. — *Can. J. Bot.* **54** : 949—959, 1976b.
- PAQUIN, R.: Effect des basses températures sur la résistance au gel de la luzerne (*Medicago media* PERS.) et son contenu en proline libre. — *Physiol. vég.* **15** : 657—665, 1977.
- SCHOBERT, B.: The influence of water stress on the metabolism of diatoms. III. The effect of different nitrogen sources on proline accumulation. — *Z. Pflanzenphysiol.* **85** : 463—470, 1977.
- SINGH, T. N., ASPINALL, D., PALEG, L. G.: Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: a potential metabolic measure of drought resistance. — *Nature* **236** : 188 to 190, 1972.
- STEWART, C. R., LEE, J. A.: The role of proline accumulation in halophytes. — *Planta* **120** : 279 to 289, 1974.
- STEWART, C. R., BOGGES, S. F.: The effect of wilting on the conversion of arginine, ornithine and glutamate to proline in bean leaves. — *Plant Sci. Lett.* **8** : 147—153, 1977.
- TREICHEL, S.: Der Einfluss von NaCl auf die Prolinkonzentration verschiedener Halophyten. — *Z. Pflanzenphysiol.* **76** : 56—68, 1975.
- TYANKOVA, L.: Stabilität von Thylakoidmembranen in Gegenwart von Aminosäuren beim Gefrieren. — *Ber. deut. bot. Ges.* **83** : 491—497, 1970.
- WYN JONES, G. R., STOREY, R. R., LEIGH, R. A., AMMAD, N., POLLARD, A.: A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation. — In: MARRÉ, E., CIFFERI, O. (ed.): *Regulation of Cell Membrane Activities in Plants*. Pp. 121—136, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam—Oxford—New York 1977.

## BOOK REVIEW

MOORE, T. C.: *RESEARCH EXPERIENCES IN PLANT PHYSIOLOGY. A Laboratory Manual. Second Ed* — Springer Verlag, New York—Heidelberg—Berlin 1981. 348 pp. Soft cover DM 45,—; approx. US \$ 20.50.

Following the recent edition of *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*, which has proved to be a very successful textbook, prof. Thomas Moore, Oregon, is publishing this second updated edition of laboratory manual for students of plant physiology. Corresponding to the author's own interest the main emphasis is placed on growth and development of plants, but 28 presented exercises also cover water relations in plants, photosynthesis and photorespiration, plant membranes and mineral nutrition. Compared to the first edition, this manual also contains experiments on phytochrome, the Hill reaction of photosynthesis, leaf movements and measurement of leaf water potential.

Individual exercises contain introductory description of investigated problems, material and methods, list of references, list of required reagents and equipments, recommendation for scheduling, headings of laboratory protocols and finally a list of questions to be answered after finishing the experiment. The introduction contains a brief description of the chronology of major discoveries, the present state of knowledge and problems to be solved. The main part, *Materials and Methods*, is written in the manner used in research papers. This approach shifts the routine student experiments towards the research laboratory work and in many cases gives the student the feeling of a scientific adventure. The book is carefully edited, it contains necessary formulas, schemes of experiments, apparatus and plant material. Its size corresponds to the usual laboratory notebook and is arranged in such a way that the protocol pages can be separated and passed to the teacher for correction. What can be recommended for the next edition is the consistent use of SI units. The book is a great help for both the students and teachers of plant physiology. One can hope that a new supplemented edition will follow with the progress of plant science.

M. KAMÍNEK (*Praha*)