

Étude anatomique et mise en évidence cytologique des mouvements de potassium et de chlore associés à l'ouverture des stomates de palmier à huile et de cocotier (1)

S. BRACONNIER (2), J. d'AUZAC (3)

Résumé. — Les stomates de palmier à huile et cocotier sont formés de 6 cellules (2 cellules de garde + 4 cellules subsidiaires). Les cellules de garde contiennent de l'amidon dans leurs chloroplastes. A l'ouverture stomatique, on note un influx de potassium dans les cellules stomatiques, ainsi qu'un flux de chlore des cellules subsidiaires latérales vers les cellules de garde. Ainsi, le chlore pourrait jouer un double rôle dans l'ouverture stomatique chez le palmier et le cocotier (il entraînerait une baisse de la turgescence des cellules subsidiaires latérales et une augmentation de celle des cellules stomatiques).

En 1971, Ollagnier et Ochs [1] ont montré pour la première fois que le chlore devait être considéré comme un élément essentiel dans la nutrition minérale du palmier à huile. Depuis, de nombreuses expériences ont confirmé le rôle primordial de la nutrition en chlore dans l'élaboration du rendement des oléagineux pérennes, en particulier du cocotier [2 à 6]. Pour ce dernier, une carence en chlore entraîne une baisse de croissance, de production de noix par arbre, de teneur en coprah des noix, ainsi qu'une moins bonne tolérance à la sécheresse et à certaines maladies. Pour le palmier à huile, une mauvaise nutrition chlorée affecte la production de régimes (baisse du poids moyen) et leur composition (diminution du nombre de fruits, de leur poids, et du poids des amandes). La correction de cette carence peut augmenter de l'ordre de 15 p. 100 la production du palmier à huile, tandis que pour le cocotier, l'augmentation peut atteindre 50 p. 100 [7, 8].

Il apparaît donc très important de comprendre le(s) rôle(s) physiologique(s) du chlore chez ces plantes. Un des sites d'action privilégiés de l'ion Cl^- pourrait être le complexe stomatique. En effet, les stomates contrôlent les échanges gazeux vitaux. Or, l'ion Cl^- peut jouer, chez certaines plantes, un rôle important dans la régulation stomatique [9].

Un influx de K^+ à l'ouverture est le phénomène quantitativement le plus important. Il peut résulter d'une différence de potentiel transmembranaire due selon les cas, à une pompe à protons (efflux), à une pompe à anions (influx), ou à des biosynthèses endogènes d'acides organiques. Il faut donc distinguer les espèces comme *Allium cepa*, qui ne possèdent pas d'amidon dans les chloroplastes des cellules de garde, des autres espèces qui en sont pour-

vues (ex : *Vicia faba*, *Commelina communis*). En effet, chez l'oignon, l'influx d'anions à l'ouverture des stomates (principalement Cl^-), est plus important que chez les autres espèces qui, elles, peuvent synthétiser *in situ* des anions organiques par l'hydrolyse de l'amidon et la glycolyse.

Cette étude a pour but de déterminer si le palmier et le cocotier possèdent de l'amidon dans les chloroplastes des cellules stomatiques ; de plus, elle doit préciser l'importance de l'ion Cl^- dans les mécanismes d'ouverture et de fermeture. Deux plantes de référence, l'arachide et l'oignon, ont été utilisées dans ce travail.

L'examen, au microscope optique, de lambeaux d'épiderme permet de mettre en évidence certaines différences anatomiques entre les complexes stomatiques des quatre plantes considérées. Ainsi, les stomates de palmier et de cocotier sont formés de 6 cellules : 2 cellules de garde et 4 cellules subsidiaires, 2 latérales + 2 polaires. Chez l'arachide, le complexe n'est formé que de 4 cellules : 2 cellules de garde et 2 cellules subsidiaires. Enfin, chez l'oignon, il semble être réduit aux deux cellules de garde (Fig. 10, 12, 14, 16).

La mise en évidence de chloroplastes dans les cellules de garde s'effectue en épiscopie, en éclairant des lambeaux d'épiderme, montés entre lame et lamelle, par une lumière de longueur d'onde de 350 à 450 nm. La chlorophylle, excitée par cette lumière, émet une fluorescence rouge caractéristique. Les figures 1 à 4, prouvent que la chlorophylle est présente dans les cellules de garde des quatre plantes étudiées. Cependant, les chloroplastes des cellules stomatiques du palmier et du cocotier ne semblent pas aussi fluorescents que ceux de l'arachide ou de l'oignon.

Le traitement de ces lambeaux par le réactif iodo-ioduré permet de visualiser l'amidon (Fig. 5 à 8). Celui-ci est présent dans toutes les cellules stomatiques, exceptées celles de l'oignon. Le fonctionnement des stomates de palmier et de cocotier n'est donc probablement pas identique à celui de l'oignon.

La mise en évidence des ions K^+ par la méthode au cobaltinitrite de sodium [11] confirme l'existence d'un influx de K^+ lié à l'ouverture des stomates (Fig. 9 à 16).

(1) Note présentée à l'Académie des Sciences de Paris par M. le Professeur Roger BUVAT et publiée dans les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris (1985, 301, Serie III, N° 9, p. 457-462).

(2) Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée USTL, et rattaché à la Division Agronomie de l'IRHO-CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

(3) Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée USTL (Université des Sciences Techniques du Languedoc), Place Eugène-Bataillon, 34060 Montpellier Cedex (France)

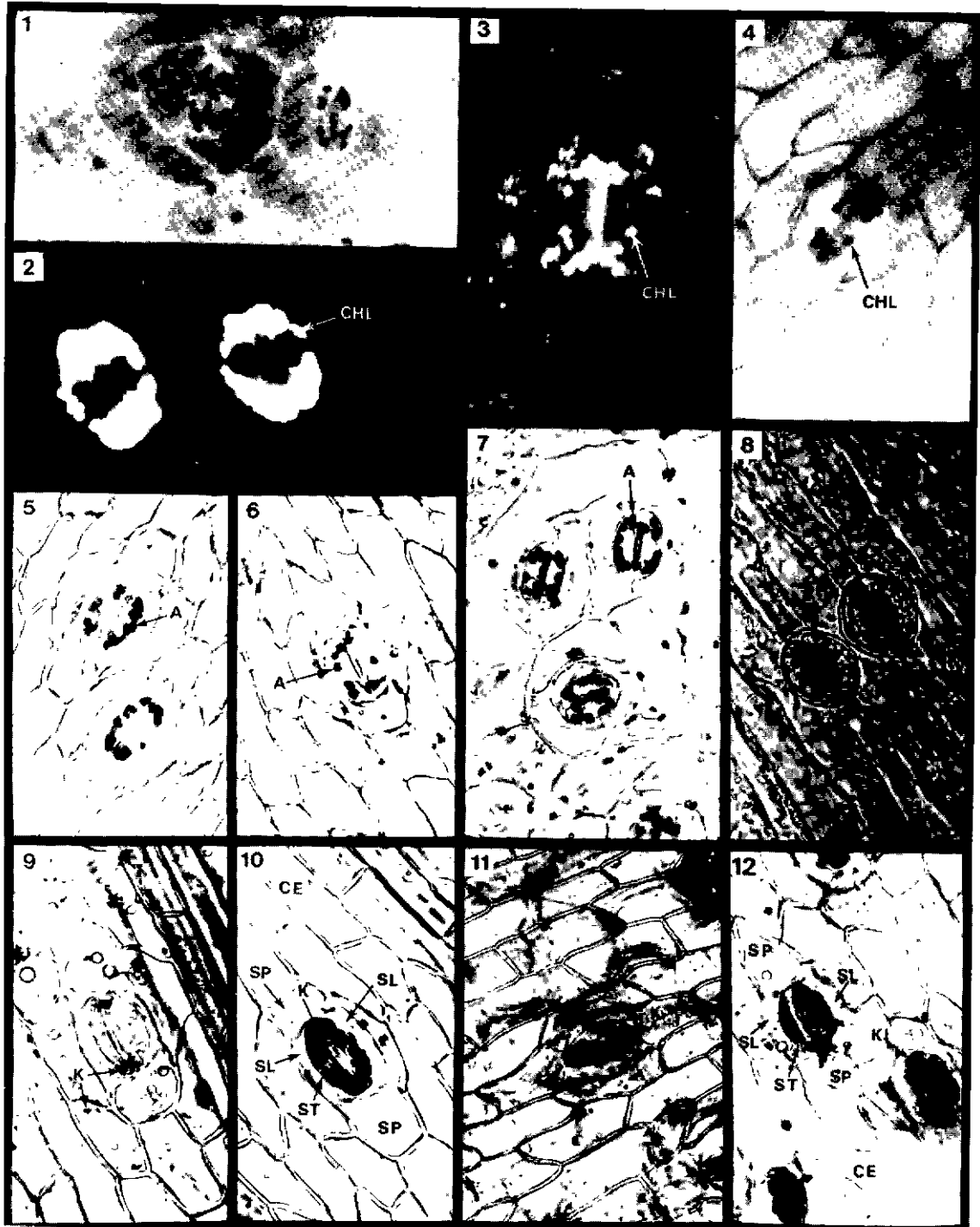


Planche 1.

Légendes des PLANCHES I et II

Abréviation sur les figures : ST, cellule stomatique ; SL, cellule subsidiaire latérale ; SP, cellule subsidiaire polaire ; CS, cellule subsidiaire ; CE, cellule épidermique ; CHL, chloroplaste ; A, amidon ; K, ion potassium ; CL, ion chlore. Chaque figure agrandie 400 fois.

(Explanation of figures : ST, stomatal cell ; SL, lateral subsidiary cell ; SP, polar subsidiary cell ; CS, epidermal cell ; CHL, chloroplast ; A, starch ; K, potassium ion ; CL, chlorine ion. Magnification is 400 for every Figures.)

Fig. 1 à 4. — Fluorescence des chloroplastes, chez l'arachide (1), l'oignon (2), le cocotier (3) et le palmier (4). Les figures sont réalisées à partir de négatifs couleurs pour l'Arachide et le Palmier, et à partir de diapositives couleurs pour l'oignon et le cocotier.

(Stomatal cell chloroplasts fluorescence from peanut (1), onion (2), coconut (3) and oil palm (4). Figures are obtained from color negatives for peanut and oil palm, and from color slides for onion and coconut.)

Fig. 5 à 8. — Coloration de l'amidon des chloroplastes des cellules de garde par le réactif iodo-ioduré chez le cocotier (5), le palmier (6), l'arachide (7) et l'oignon (8).

(Guard cell chloroplast starch stained with potassium iodide reagent in coconut (5), oil palm (6), peanut (7) and onion (8).)

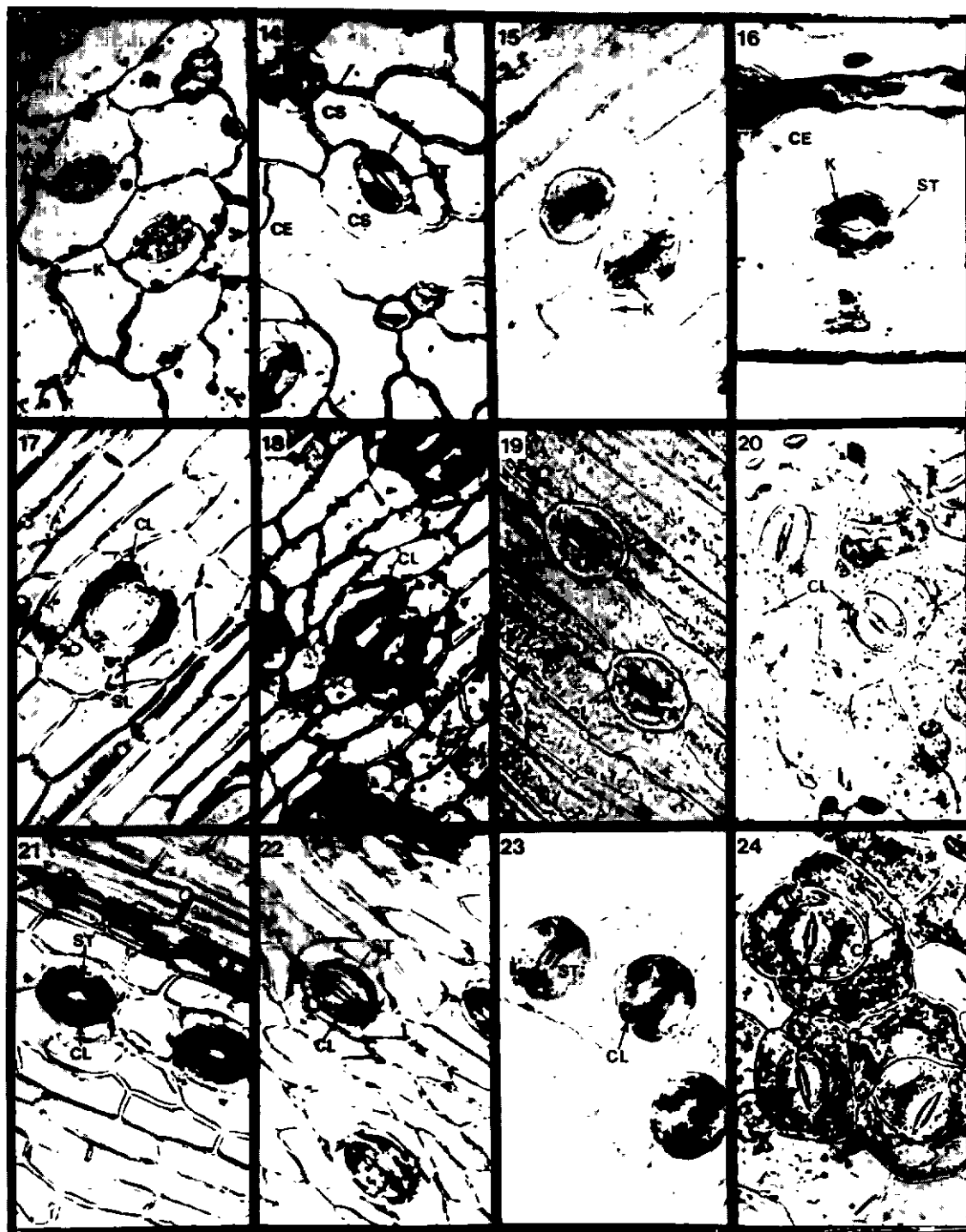


Planche II.

Légendes des PLANCHES I et II

Fig. 9 à 16. — Etude des mouvements de potassium par coloration au cobaltinitrite de sodium. Pour les figures 9 (cocotier), 11 (palmier), 13 (arachide) et 15 (oignon), les lambeaux sont colorés après un traitement de 4 h sur de l'eau distillée, à l'obscurité, les stomates sont fermés. Dans les cas 10 (cocotier), 12 (palmier), 14 (arachide), et 16 (oignon), la coloration est réalisée après un traitement destiné à faire ouvrir les stomates (4 h sur une solution KCl 100 mM, pH 6,3, à la lumière, dans une atmosphère appauvrie en CO₂).

(Study of potassium movement by staining with sodium cobaltinitrite. For Figures 9 (coconut), 11 (oil palm), 13 (peanut) and 15 (onion), epidermal sections are stained after a treatment for 4 hrs. on distilled water in the dark; stomata are closed. In Figures 10 (coconut), 12 (oil palm), 14 (peanut) and 16 (onion), Cl⁻ is stained after a treatment to open stomata 4 hrs, on KCl solution 100 mM pH 6,3, in the light, under a CO₂ free air.)

Fig. 17 à 24. — Coloration des ions Cl⁻ par le nitrate d'argent. Les traitements appliqués sont identiques aux précédents. Les lambeaux subissent en plus un prétraitement de 3 h sur un tampon MES (acide 2, N morpholino éthane sulfonique) 10 mM, pH 3,9, dans le but de détruire les cellules épidermiques, tout en conservant l'intégrité des cellules stomatiques. Les figures 17, 18, 19, 20, représentent respectivement des stomates fermés de cocotier, palmier, oignon et arachide. Les figures 21, 22, 23 et 24 montrent respectivement ces mêmes stomates, mais ouverts.

(Cl⁻ ion are stained by silver nitrate. Treatments are the same as the former ones. In addition, sections go through a pretreatment of 3 hrs. in a MES (2 N morpholino ethane sulfonic acid) buffer 10 mM, pH 3,9, to destroy epidermal cells, this does not effect stomatal cell integrity. Figures 17, 18, 19, 20 show respectively closed stomata of coconut, oil palm, peanut and onion. Figures 21, 22, 23 and 24 show respectively the same but opened stomata.)

Le Cl^- a été visualisé par la technique au nitrate d'argent [11]. Pour l'arachide (Fig. 20 et 24), qui est une plante très tolérante vis-à-vis du chlore [12], la distribution des anions Cl^- ne paraît pas modifiée selon l'ouverture stomatique. Il en va tout autrement pour le palmier, le cocotier et l'oignon, où les chlorures s'accumulent dans les cellules de garde des stomates ouverts (Fig. 21 à 23). Chez le palmier et le cocotier, le chlore joue en tant qu'osmoticum, un double rôle dans le mouvement stomatique. A l'état fermé, il est localisé dans les cellules subsidiaires latérales (Fig. 17 et 18), et il contribue ainsi au maintien de la turgescence de ces cellules, laquelle s'oppose à l'ouverture stomatique. A l'ouverture, Cl^- migre vers les cellules de garde et provoque simultanément une baisse de la turgescence des cellules subsidiaires latérales et une augmentation de celle des cellules de garde, favorisant l'ouverture. Ainsi, dans le cas du palmier et du cocotier, même si l'influx de Cl^- , dans les cellules stomatiques lors de l'ouverture, est plus faible que chez l'oignon, son action n'en est pas moins importante, compte tenu du double rôle que peut jouer Cl^- en tant qu'osmoticum. Ceci est confirmé par le fait que la suppression des ions Cl^- dans le milieu de traitement entraîne une modification du degré d'ouverture. Rappelons qu'en 1980, Schnabl et Raschke [12] ont montré que s'ils remplaçaient les ions Cl^- du milieu de trempage des lambeaux d'épiderme, par des anions imperméants (iminodiacétate), les stomates d'oignon ne s'ouvriraient plus. Cette expérience appliquée au cocotier entraîne une diminution d'ouverture stomatique de 27 p. 100 environ. L'ouverture moyenne (après un prétraitement de 3 h sur

un tampon MES 10 mM, pH 3,9, puis 4 h sur une solution de KCl 100 mM, pH 6,3, à la lumière, dans une atmosphère appauvrie en CO_2), est de $6,12 \pm 0,23 \mu\text{m}$; alors qu'elle n'est que de $4,45 \pm 0,16 \mu\text{m}$ sur le milieu dépourvu de chlore (les valeurs rapportées sont obtenues à partir de 420 mesures). Chez le palmier, aucune baisse statistiquement significative n'est enregistrée. Cl^- semble donc jouer, chez le cocotier, un rôle plus déterminant dans les mouvements stomatiques, que chez le palmier, au moins dans nos conditions expérimentales où subsiste chez les deux plantes une certaine quantité de Cl^- endogène.

En résumé, la microscopie optique a permis de mettre en évidence :

1 — la présence de chloroplastes et d'amidon dans les cellules stomatiques de cocotier et de palmier qui laisse la porte ouverte à une synthèse possible d'acides organiques endogènes ;

2 — un influx de potassium dans les cellules de garde chez le cocotier, le palmier, l'arachide et l'oignon ;

3 — un flux de Cl^- des cellules subsidiaires latérales vers les cellules stomatiques lors de l'ouverture, chez le palmier et le cocotier. Ce flux est particulièrement important chez le cocotier, où l'absence de Cl^- dans le milieu de traitement provoque une diminution d'ouverture de l'ordre de 27 p. 100. Cet influx de Cl^- pourrait intervenir conjointement à la synthèse possible d'acides organiques citée plus haut. L'effet notable du Cl^- chez le cocotier peut provenir de son double rôle lors de l'ouverture stomatique (baisse de la turgescence des cellules subsidiaires latérales et augmentation de celle des cellules de garde).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] OLLAGNIER M., OCHS R. (1971). — Le chlore, nouvel élément essentiel dans la nutrition du palmier à huile (bilingue fr.-angl.) *Oléagineux*, 26, N° 1, p. 1-15.
- [2] Von UEXKULL H. R. (1972). — Response of coconuts to (potassium) chloride in the Philippines (bilingue angl.-fr.) *Oléagineux*, 27, N° 1, p. 13-19.
- [3] OLLAGNIER M. (1973). — La nutrition anionique du palmier à huile. Application à la détermination d'une politique de fumure minérale à Sumatra (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 28, N° 1, p. 1-10.
- [4] DANIEL C., MANCIOT R. (1973). — La nutrition en chlore des jeunes cocotiers aux Nouvelles-Hébrides. *Oléagineux*, 28, N° 2, p. 71-72.
- [5] DANIEL C., OCHS R. (1975). — Amélioration de la production des jeunes palmiers à huile du Pérou par l'emploi d'engrais chloré. *Oléagineux*, 30, N° 7, p. 295-298.
- [6] MAGAT S. S., CADIGAL V. L., HABANA J. A. (1975). — Yield improvement of coconut in elevated inland area of Davao (Philippines) by KCl fertilization (bilingue angl.-fr.). *Oléagineux*, 30, N° 10, p. 413-418.
- [7] OLLAGNIER M., OCHS R., POMIER M., TAFFIN G. de (1983). — Action du chlore sur le cocotier hybride PB-121 en Côte d'Ivoire et en Indonésie. Développement, tolérance à la sécheresse, production (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 38, N° 5, p. 309-321.
- [8] OLLAGNIER M., OLIVIN J. (1984). — Effet de la nutrition sur la production. Progrès génétiques et effets de la nutrition sur la qualité de l'huile de palme — 1^{re} partie (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 39, N° 7, p. 349-368.
- [9] SCHNABL H. (1978). — The effect of Cl^- upon the sensitivity of starch-containing and starch-deficient stomata and guard cell protoplasts towards potassium ions, fusicoccin and abscisic acid. *Planta*, N° 144, p. 95-100.
- [10] ZEIGER E. (1983). — The biology of stomatal guard cells. *Ann Rev Plant Physiol.*, N° 34, p. 441-475.
- [11] RASCHKE K., FELLOWS M. P. (1971). — Stomatal movement in *Zea mays* shuttle of potassium and chloride between guard cells and subsidiary cells. *Planta*, N° 101, p. 296-316.
- [12] SCHILLING R., HIRSCH P. J. (1974). — La nutrition en chlore de l'arachide au Sénégal (bilingue fr.-angl.) *Oléagineux*, 29, N° 2, p. 85-90.
- [13] SCHNABL H., RASCHKE K. (1980). — Potassium chloride as stomatal osmoticum in *Allium cepa* L., a species devoid of starch in guard cells. *Plant Physiol.*, N° 65, p. 88-93.

SUMMARY

Anatomical study and cytological demonstration of potassium and chlorine flux associated with oil palm and coconut stomatal opening.

S. BRACONNIER, J. d'AUZAC, *Oléagineux*, 1985, 40, N° 11, p. 547-551.

Oil palm and coconut stomata are composed of 6 cells (2 guard cells + 4 subsidiary cells). Guard cell chloroplasts contain starch. On stomatal opening, there occurs a potassium flux into stomatal cells and also a chlorine flux from lateral subsidiary cells into the guard cells. Thus, chlorine perhaps plays a double role in oil palm and coconut stomatal opening (it can result in a lateral subsidiary cell turgidity fall and a stomatal cell turgidity increase).

RESUMEN

Estudio anatómico y puesta en evidencia citológica de los movimientos de potasio y de cloro asociados con la apertura de estomas de la palma africana y del cocotero.

S. BRACONNIER, J. d'AUZAC, *Oléagineux*, 1985, 40, N° 11, p. 547-551.

Los estomas de palma africana y del cocotero son formados por 6 células (2 células de protección + 4 células anexas). Las células de protección contienen almidón en los cloroplastos. Al abrirse los estomas se nota un influjo de potasio en las células estomáticas, así como un flujo de cloro, desde las células anexas laterales hasta las células de protección. El cloro podría entonces desempeñar una doble función respecto a la apertura estomática para la palma africana y el cocotero (este elemento provocaría una disminución de turgencia de las células anexas laterales y un incremento de la misma en las células estomáticas).

Anatomical study and cytological demonstration of potassium and chlorine flux associated with oil palm and coconut stomatal opening (1)

S. BRACONNIER (2) and J. D'AUZAC (3)

In 1971, Ollagnier and Ochs [1] showed for the first time that chlorine should be considered an essential element in oil palm mineral nutrition. Since then, numerous experiments have confirmed that chlorine nutrition plays a major role in perennial oil crop yield improvement, especially in coconut [2-6]. For the latter, chlorine deficiency brings about a decline in growth, a reduction in nut production per tree and copra content per nut, along with lower tolerance to drought and certain diseases. For oil palm, poor chlorine nutrition influences bunch production (reduction in average weight) and its structural composition (less fruit, lower weight per fruit and per kernel). Correcting this deficiency can increase production by about 15 p. 100 in oil palm and up to 50 p. 100 in coconut [7, 8].

Understanding the physiological role(s) of chlorine in plants therefore seems to be of utmost importance. The stomatal complex could be one of the most important areas of activity for the Cl^- ion. In effect, stomata control vital gaseous exchanges. In certain plants, the Cl^- ion can play an important role in stomatal regulation [9].

Quantitatively speaking, an influx of K^+ on stomatal opening is the most important phenomenon. This can result from a change in trans-membrane potential, caused by the pumping of protons (efflux), the pumping of anions (influx) or the endogenous biosynthesis of organic acids, depending on the plant. Hence, species such as *Allium cepa*, whose guard cell chloroplasts lack starch, must be distinguished from other species with starch in the guard cells (*Vicia faba*, *Commelina communis*). In the former (onion), the influx of anions on stomatal opening (chiefly Cl^-) is in effect much greater than that of other species which can synthesize organic anions *in situ* by means of glycolysis and starch hydrolysis.

The objective of this study is to find out whether starch is present in oil palm and coconut stomatal cell chloroplasts and to determine the role played by Cl^- ions in stomatal opening and closing mechanisms. Peanut and onion are used as reference plants in this study.

The examination of epidermal sections under an optical microscope reveals anatomical differences in the stomatal complex of the four plants considered. Hence, oil palm and coconut stomata are composed of 6 cells : 2 guard cells and 4 subsidiary cells, of which 2 lateral and 2 polar ; whilst peanut stomata have 4 cells : 2 guard cells and 2 subsidiary cells. Finally, the onion seems to be composed of only 2 guard cells (Figures 10, 12, 14, 16).

To detect chloroplasts in the guard cells, episcopic techniques are used. The epidermal sections, mounted between two slides, are subjected to light with wavelengths ranging from 350 to 450 nm and the chlorophyll, activated by this light, emits a characteristic

red fluorescence. Figures 1-4 confirm that chlorophyll is present in the guard cells of all four plants under consideration. Nonetheless, oil palm and coconut stomatal cell chloroplasts do not appear to be as fluorescent as those of peanut or onion.

The epidermal sections are then treated with a potassium iodide reagent, which makes the starch visible (Fig. 5-8). This is present in all the stomatal cells, except those of the onion. Hence, it is probable that oil palm and coconut stomata function differently.

Determining the presence of K^+ ions with sodium cobaltinitrite [11] confirms that a K^+ influx is associated with stomatal opening (Fig. 9-16).

The silver nitrate technique is used to make Cl^- visible [11]. In peanut (Fig. 20, 24) which is very tolerant to chlorine [12], stomatal opening does not seem to modify Cl^- anion distribution. Conversely, in oil palm, coconut and onion, chlorides accumulate in the guard cells of open stomata (Fig. 21-23). In oil palm and coconut, chlorine plays a double role in stomatal osmotic movement. When stomata are closed, it is found in the subsidiary lateral cells (Fig. 17, 18), helping to maintain cell turgidity, which prohibits stomatal opening. On the other hand, when stomata are open, Cl^- migrates towards the guard cells, simultaneously reducing subsidiary lateral cell turgidity and increasing that of the guard cells, which encourages stomatal opening. Hence, in oil palm and coconut, even if the Cl^- influx in stomatal cells during opening is lower than that of the onion, its importance is no less, considering the double role Cl^- can play in osmotic movement. This is confirmed by the fact that reducing Cl^- in the treatment medium modifies the degree of stomatal opening. It can be recalled that in 1980, Schnabl and Raschke [12] showed that if Cl^- ions in the treatment medium were replaced with impermeable anions (iminodiacetate), onion stomata no longer opened. Applied to coconut, this experiment reduces stomatal opening by about 27 p. 100. Average opening is $6.12 \pm 0.23 \mu\text{m}$ (after a 3-hour pretreatment in a MES 10 mM buffer, pH 3.9, then 4 hours in a KCl 100 mM solution, pH 6.3, under light in CO_2 impoverished air), whilst it is only $4.45 \pm 0.16 \mu\text{m}$ in a chlorine-free medium (based on 420 measurements). In oil palm, no statistically significant reduction in stomatal opening was recorded. Hence it would seem that Cl^- plays a more important role in stomatal action in coconut than in oil palm, at least under our experimental conditions, where a certain quantity of endogenous Cl^- was recorded in both plants.

To conclude, techniques using optical microscopes enable the following to be determined :

1 — The presence of chloroplasts and starch in oil palm and coconut stomatal cells, which provides leeway for a possible synthesis of endogenous organic acids ;

2 — An influx of potassium to the guard cells of coconut, oil palm, peanut and onion ;

3 — A Cl^- flux from the lateral subsidiary cells to the guard cells during stomatal opening in oil palm and coconut. This flux is considerable in coconut, where the absence of Cl^- in the treatment medium reduces stomatal openings by about 27 p. 100. This Cl^- influx could occur together with the possible synthesis of organic acids mentioned above. The considerable Cl^- effect in coconut can arise from its double role during stomatal opening (reduction of subsidiary lateral cell turgidity and increase in that of the guard cells). □

(1) Paper presented to the Academie des Sciences, Paris by Professor Roger BUVAT and published in the « *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* », 1985, 301, Serie III, N° 9, p. 457-462

(2) Applied Plant Physiology Laboratory USTL, and attached to the IRHO-CIRAD Agronomy Division, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

(3) Applied Plant Physiology Laboratory (USTL) Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Place Eugène-Bataillon, 34060 Montpellier Cedex (France).