

**Zeitschrift:** Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse  
**Herausgeber:** Schweizerische Botanische Gesellschaft  
**Band:** 60 (1950)

**Artikel:** Recherches sur l'imperméabilité des graines dures chez les légumineuses  
**Autor:** Cavazza, L.  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-42142>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 08.02.2025

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# Recherches sur l'imperméabilité des graines dures chez les légumineuses

Par *L. Cavazza*

(Institut de physiologie végétale de l'E. P. F. de Zurich)

Manuscrit reçu le 7 août 1950

On appelle graines dures celles qui, mises dans des conditions adéquates d'humidité et de température, ne gonflent pas et par conséquent ne germent pas, même après plusieurs années. Ce phénomène est dû à l'imperméabilité du tégument à l'eau. Les recherches effectuées pour établir la cause de cette imperméabilité, bien qu'elles aient été entreprises depuis fort longtemps, n'ont pas encore permis de trancher cette question et les opinions des différents auteurs sont extrêmement contradictoires.

L'imperméabilité des graines dures chez les légumineuses étant d'un grand intérêt tant du point de vue botanique qu'au point de vue agronomique, il nous a semblé intéressant d'en reprendre l'étude à l'aide de diverses méthodes convergentes.

Avant d'exposer les hypothèses émises jusqu'à ce jour, il est indispensable de décrire brièvement l'anatomie du tégument de la graine chez les légumineuses.

D'après la bibliographie, il semble que la couche cellulaire externe corresponde à l'épiderme externe de la membrane interne de l'ovule. Cette couche est constituée par des cellules allongées dans le sens radial soit en forme de prismes à base polygonale, soit en claveau, formant palissade. Ces cellules ont été décrites sous différents vocables, parmi lesquels nous ne retiendrons que la dénomination de « cellules malpighiennes » du nom de *Marcel Malpighi* qui les observa le premier. La longueur des cellules est très variable (de 18 à 320  $\mu$ ). *Mattirolo*, *Buscaglioni* et *Giardinelli* ont trouvé un rapport direct entre cette longueur et la grandeur de la graine. Ces cellules ont fréquemment un lumen étroit, généralement élargi à la base. La membrane latérale est renforcée irrégulièrement par des bandes de cellulose, qui deviennent plus épaisses dans la partie haute et pénètrent dans le lumen de la cellule. L'extrémité externe des cellules malpighiennes présente un aspect tantôt aplati, tantôt en forme de calotte ou en pointe (« cono » des Italiens et « cap » des Anglais). La cuticule, qui peut recou-

vrir la graine, est mince. Une couche d'épaisseur très variable, que *Mattirolo* et *Buscaglioni* ont décrite comme étant de nature mucilagineuse et analogue au revêtement des espaces intercellulaires, serait située entre cette cuticule et la base supérieure des cellules malpighiennes.

Ces dernières sont traversées, près de leurs extrémités externes ou plus en dessous, par une ligne ou bande caractéristique, qui se distingue du reste de la membrane par ses propriétés optiques. Bien que *Malpighi* l'ait déjà observée en 1675, la nature et la signification exacte de cette ligne restent à élucider. On l'a appelée «*linea alba, l. lucida, l. pelucida, Lichtlinie, Lichtzone*», etc. Elle s'étend à travers la membrane des cellules malpighiennes. Son épaisseur est variable; selon les espèces, elle peut avoir des bords nets ou confus. Elle peut être plus ou moins luisante. Dans quelques cas, cette ligne réfringente est peu visible ou manque complètement; dans d'autres cas, on peut avoir des lignes surnuméraires. *Hambly*; en lumière polarisée, aurait dédoublé cette ligne. En section transversale, elle ne serait pas visible (*Junovicz*). Quelques auteurs ont démontré l'existence de petits canaux ou pores, qui traversent la «*linea lucida*».

A l'examen microchimique, la membrane des cellules malpighiennes se révèle constituée par de la cellulose. Selon *Eames* et *MacDaniels*, elle peut être fortement cutinisée ou lignifiée; pour *Mattirolo*, au contraire, seulement chez *Baptisia*, la lamelle moyenne serait lignifiée. *Ippolito*, *Hambly* et *Watson* ont trouvé que la partie apicale de la cellule est subérifiée. La ligne réfringente retient plus difficilement les couleurs que le reste de la membrane. L'existence de cette ligne serait due pour *Rossow* à des causes physiques et en particulier à une plus grande compacité et sécheresse de la membrane à ce niveau. D'autres auteurs ont une opinion similaire, mais *Wettstein*, *Sempolowski*, *Tschirch*, etc. ne trouvent aucune différence dans le contenu en eau. Pour *Junovicz*, la ligne est déterminée par une constitution moléculaire particulière, favorable à une forte réfraction de la lumière. *Hambly* pense qu'elle dérive de la juxtaposition de la subérine de l'extrémité de la cellule et de la cellulose de la partie inférieure. *Lodhe* soutient l'origine chimique, mais ses idées sur la cuticularisation seraient erronées selon *Netolitzky*. Quelques auteurs la décrivent comme lignifiée ou cuticularisée, mais *Mattirolo* et d'autres excluent la présence de lignine dans la ligne claire chez les légumineuses. *Tunmann* suppose qu'elle pourrait être due simultanément à des causes physiques et chimiques et pense qu'elle est de nature pectique ou callosique. Pour *Küster*, elle serait due à des lamelles d'épaississement en forme d'anneau et, selon *Eames* et *MacDaniels*, elle serait déterminée par la déposition de gouttes de cire dans le lumen cellulaire. La ligne réfringente semble correspondre au

premier épaissement de la membrane, formé par de petits coussins réfringents, qui se forment à un niveau indépendant de la longueur finale de chaque cellule.

Après incinération, le squelette des cellules malpighiennes reste intact, mais la « *linea lucida* » n'est plus bien déterminable. Les cendres contiennent beaucoup de calcaire et de silice. La cuticule est particulièrement riche en calcaire (Marlière).

La couche malpighienne est toujours unique, selon Netolitzky, et la découverte d'une autre couche superposée serait due à des erreurs d'observation.

Sous la couche malpighienne se trouve une couche unicellulaire, riche en espaces intercellulaires (cellules en sablier); on peut trouver quelquefois une couche intermédiaire formée de grandes cellules. Le reste du tégument est formé d'une couche basale pluristratifiée, quelquefois différenciée en une partie supérieure, moyenne et inférieure.

Selon Mattiolo et Frémy, le tégument des légumineuses n'aurait pas de lignine; pourtant Harz semble en avoir trouvé dans de nombreux cas, particulièrement dans la région basale près des vaisseaux, mais aussi jusqu'aux cellules en sablier. Eames et Mac Daniels disent que la lignine est normalement présente dans les cellules malpighiennes.

L'examen anatomique ne montre pas, en général, de différence entre les graines dures et les graines perméables, mais D'Ippolito aurait observé que dans les graines dures, les pores, qui traversent la ligne réfringente, présentent un étranglement. White, Rees et Eames et Mac Daniels trouvent que dans quelques cas l'épaisseur de la cuticule augmente avec l'imperméabilité du tégument. Pour Coe Martin, la ligne réfringente serait plus large chez les graines dures; le lumen cellulaire serait plus étroit sous la ligne.

\* \* \*

Par les caractères anatomiques et le comportement des graines dures à de différents traitements, on a essayé d'expliquer l'imperméabilité du tégument. D'Ippolito (1905) soutient que la ligne réfringente lignifiée des graines dures empêche l'eau d'entrer par ses canaux plus ou moins oblitérés. Selon Coe Martin (1920), chez *Melilotus alba* et *M. officinalis*, le gonflement serait empêché par la ligne claire, qui, dans les graines dures, serait plus large. Gola (1905) donne une explication bien différente. Il pense que dans la graine normalement mûre, les cellules malpighiennes, en séchant, se séparent des tissus sous-jacents et parfois entre elles; elles permettent ainsi à l'eau d'entrer. Dans les graines dures, moins mûres, par suite d'une constitution incomplète des pectines, les cellules ne se détachent pas et en contact avec l'eau, en s'opposant, elles empêchent l'augmentation de volume et par conséquent l'absorption

de l'eau. Netolitzky (1926) suppose que chez *Lupinus* l'imperméabilité peut être due en partie au contenu en calcaire et en silice des cellules malpighiennes. White (1908), Rees (1911) et Eames et Mac Daniels (1947) sont d'avis que la cuticule dans les graines de petite et moyenne grandeur augmente d'épaisseur quand l'imperméabilité augmente et serait la cause de la non-pénétration de l'eau. Selon Hamblly (1932) ce sont les pointes des cellules malpighiennes qui, en étant subérifiées, forment une couche imperméable. Néanmoins une étude plus récente de Watson (1949) démontre qu'on ne relève aucune relation entre la composition chimique des couches du tégument et son comportement envers l'eau.

Crocker (1916) supposait que la perméabilisation des graines dures était obtenue par une modification de l'état colloïdal des constituants chimiques du tégument et d'autres auteurs sont aussi de cet avis. L'importance de l'état colloïdal est confirmée par les résultats des traitements à l'eau chaude et se trouve renforcée par la théorie de la réversibilité de la dureté des graines de l'école de Hambourg, à laquelle cependant s'opposent Hamblly et Ranker.

Après ce très rapide exposé, qui laisse entrevoir l'incertitude qui règne encore dans ce domaine, nous allons passer à l'exposé de la partie expérimentale.

### Partie expérimentale

Nous nous sommes proposé d'étudier l'anatomie du tégument en relation avec l'imperméabilité des graines dures.

#### *Matériel utilisé*

Dans nos expériences, nous avons examiné de la semence de *Gleditschia triacanthos* L. (Caesalpinaceae) produite à Bari (Italie) en 1948, avec 100 % de graines dures. La graine a une couleur brune sombre. Elle est grosse (volume de 1000 graines = 135 cm<sup>3</sup>) et a une forme analogue à un ellipsoïde à trois axes. Elle est anatrophe, à tégument très épais et très dur.

Nous avons encore examiné la graine de *Hedysarum coronarium* (Papilionaceae) de 1948, provenant de Ascoli Piceno (Italie) et ayant une germinabilité de 84 % et un pourcentage de 13 % de graines dures. Cette graine est bien plus petite (volume de 1000 graines = 4,37 cm<sup>3</sup>) et a une forme particulière, qui rappelle celle d'un haricot. La graine est campylotrope, avec un tégument assez mince.

### Technique

<sup>10</sup> En premier lieu, nous avons cherché à obtenir de bonnes préparations microscopiques. Nous n'avons employé que rarement le microtome à main, qui donne des coupes trop épaisses. La méthode classique de l'inclusion en paraffine

est inutilisable, car la déshydratation nécessaire redonne au tégument, gonflé dans l'eau, sa dureté initiale. N'ayant pas à notre disposition des cires hydrosolubles, conseillées par S a s s, nous avons appliqué la méthode de G o d f r i n modifiée et perfectionnée par L a b o u r e u r au savon-paraffine, avec quelques petites variations.

L'objet, préalablement fixé avec la solution F. A. A. (formaldéhyde, alcool, acide acétique glacial), puis lavé dans de l'eau pendant cinq heures environ, est plongé dans un mélange de G o d f r i n, dont la quantité d'alcool a été réduite dans la proportion suivante pour empêcher le durcissement des tissus.

	Mélange Godfrin	Modification
eau . . . . .	g. 25,0	105,0
glycérine . . . . .	g. 20,0	20,0
gélatine . . . . .	g. 2,5	2,5
alcool à 90° . . . . .	g. 160,0	80,0
savon . . . . .	g. 50,0	50,0

On place le tout dans une étuve à 50°—60° jusqu'à évaporation de l'alcool et de l'eau; en refroidissant, le mélange durcit. Après avoir isolé la pièce et enlevé le surplus de savon qui l'entoure, l'objet est inclus selon le procédé ordinaire dans de la paraffine fondue, dans laquelle le savon se dissout. Cette méthode nous a permis d'obtenir des coupes d'une épaisseur allant jusqu'à 4  $\mu$ .

2° Pour obtenir des sections de graines non gonflées, et pourtant très dures, nous avons utilisé la méthode par coupe mince minéralogique, usée à la meule, déjà appliquée à l'étude des graines par R o d r i g u e z. L'échauffement de la graine devant être évité pendant l'opération, nous avons éprouvé quelques difficultés dans le choix du lubrifiant. L'eau était rapidement absorbée par la graine; l'alcool et le xylol, attaquant la résine qui fixe la graine sur la lame de verre, étaient inutilisables. Aussi avons-nous commencé l'usure avec très peu d'eau et nous avons terminé à sec en meulant très lentement, afin d'éviter l'échauffement. Les résultats ont été satisfaisants.

3° Pour pouvoir observer des cellules malpighiennes isolées, nous avons macéré des téguments pendant une nuit dans de l'eau oxygénée à 10 %. Nous les avons ensuite faits bouillir pendant une première heure dans de l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2,5 %, puis pendant une seconde heure dans une solution de NaOH à 2,5 %. Les téguments ainsi traités furent enfin broyés au « Blendor » pour séparer les cellules.

4° L'analyse microchimique, les examens en lumière ultraviolette, en lumière polarisée et au microscope électronique ont été normalement exécutés.

5° Pour la détermination de l'index de réfraction (méthode par immersion et observation en lumière polarisée), nous avons choisi comme liquides des mélanges de butylstéarate ( $n = 1,444$ ), de tricrésylphosphate ( $n = 1,555$ ) et de monobromenaphtaline ( $n = 1,658$ ), qui s'évaporent très lentement.

## Résultats

### I. Examen anatomique

Le n° 1 de la planche montre une section de tégument chez *Gleditschia triacanthos*. A la partie inférieure se trouve la couche basale à grandes cellules aplaties dans le sens radial, avec des parois très épaisses et

sans espaces intercellulaires. Cette couche a une épaisseur variable, qui est plus grande à la région hilare (0,89 mm.) et à l'autre pôle de la graine (0,49 mm.); la couche est plus mince sur les faces (0,13 mm.) et d'une épaisseur intermédiaire le long du bord (0,38 mm.).

Au-dessus de cette couche on trouve les cellules en sablier ( $2,7 \times 2,2 \mu$ ). Elles sont étranglées dans leur partie centrale et présentent des parois très épaisses et de larges espaces intercellulaires.

Les cellules malpighiennes sont très allongées (longueur  $134,9 \mu$ , largeur  $9,5 \mu$ ). Leur lumen semble un peu élargi à la base, tandis qu'il est étroit le long de la cellule. A proximité de la ligne réfringente, on peut parfois distinguer deux ou trois petits canaux. Plus rarement ces canaux semblent s'étendre au-delà de cette ligne. Dans le lumen, on

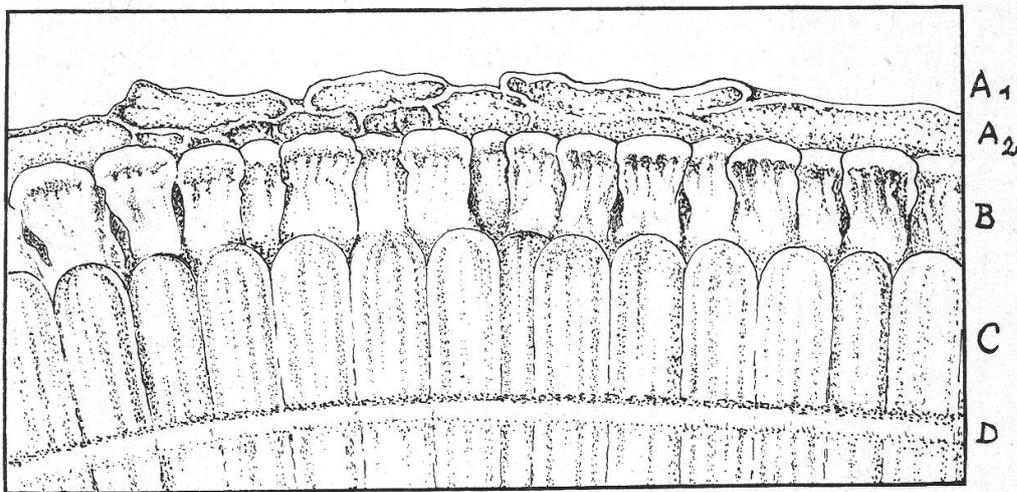


Figure 1

Couches qui surmontent les cellules malpighiennes chez *Gleditschia triacanthos* (gr. 750 fois). (Voir n° 1 de la planche.)

trouve des restes granuleux bruns du cytoplasme. Ces restes sont très souvent accumulés à la base, vers le milieu du lumen et dans les canaux au-dessous de la ligne réfringente. Celle-ci est épaisse de  $4,8 \mu$  environ. Elle traverse la cellule au trois-quart de sa hauteur. Au-dessus de la ligne il est difficile de distinguer le lumen, qui ne contient presque pas de restes cytoplasmiques, et la membrane est fortement striée à cet endroit. Les extrémités supérieures des cellules malpighiennes se terminent en calotte et forment une ligne faiblement réfringente.

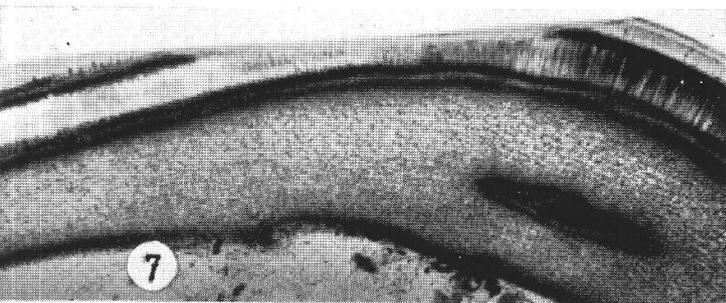
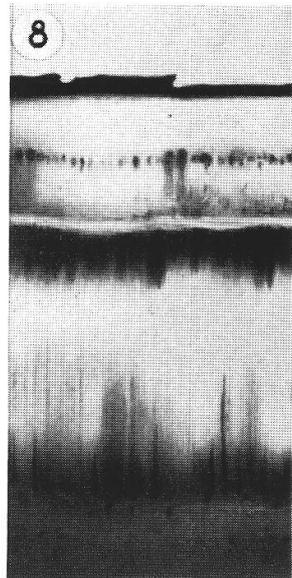
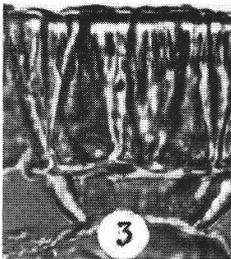
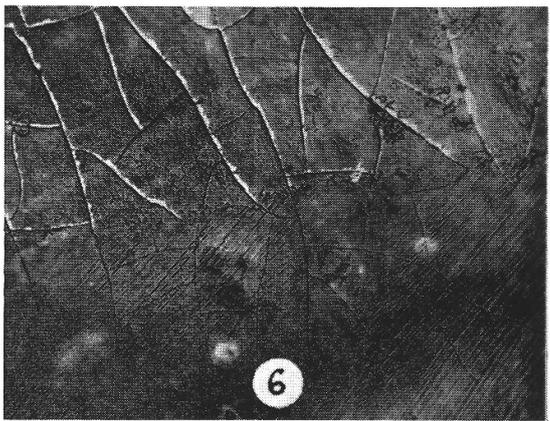
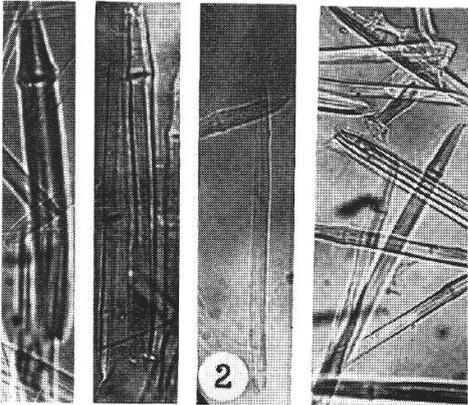
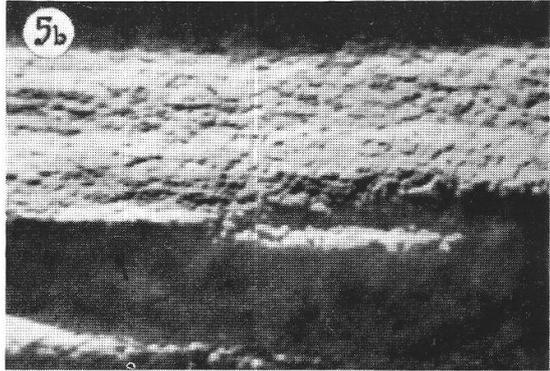
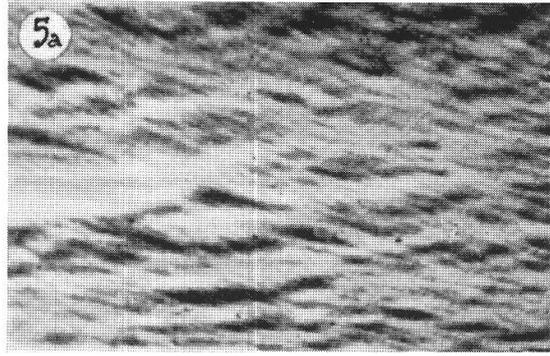
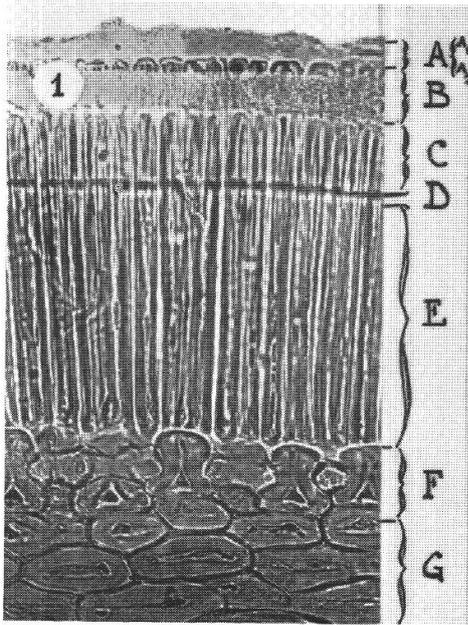
La zone au-dessus des cellules malpighiennes ( $24,4 \mu$  d'épaisseur) ne se laisse pas observer aisément sur des coupes de  $4 \mu$ . Les sections de  $10 \mu$  (voir figure 1) démontrent clairement que, contrairement à ce qu'a été soutenu jusqu'à présent, cette zone est constituée de différentes couches cellulaires. La couche inférieure est formée par des cellules un peu plus larges, mais plus courtes ( $18,1 \times 9,5 \mu$ ) que les cellules mal-

## Légende de la planche IV

- N° 1 Section du tégument de la graine chez *Gleditschia triacanthos* (gr. 250 fois)  
A } cellules extérieures (voir fig. 1)  
B }  
C—E cellules malpighiennes  
D ligne réfringente (linea lucida)  
F cellules en sablier  
G cellules aplaties
- N° 2 Cellules malpighiennes macérées (gr. 250 fois)
- N° 3 Section du tégument de la graine chez *Hedysarum coronarium* (gr. 600 fois)
- N° 4 Tégument de *Gleditschia* traité avec de l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc.;  
cellules malpighiennes et couches supérieures (gr. 270 fois)  
→ ces points blancs représentent la ligne réfringente
- N° 5 Structure de la membrane des cellules malpighiennes chez *Gleditschia*  
(microscope électronique, gr. 25 000 fois)  
a au-dessous de la ligne réfringente  
b à l'endroit de la ligne
- N° 6 Réplique de surface de la graine de *Gleditschia*. Supérieurement, surface intacte; inférieurement, section oblique (gr. 80 fois)
- N° 7 Coupe par usure du tégument de *Gleditschia*. Détermination de l'épaisseur de la zone imperméable (microscope polarisant, gr. 100 fois)
- N° 8 Coupe par usure du tégument de *Gleditschia*. Détermination du commencement de la zone imperméable (microscope polarisant, gr. 250 fois)

(Microphotographies L. Cavazza)

Planche IV



Leere Seite  
Blank page  
Page vide

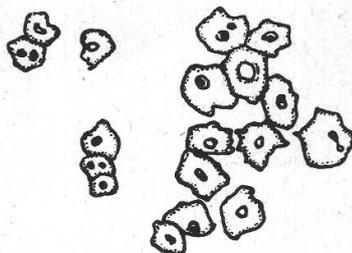
pighiennes. Elles ont un grand lumen et une membrane pourvue de bandes longitudinales, qui deviennent plus épaisses vers la partie supérieure. L'extrémité des cellules est épaisse et forme une ligne assez réfringente (voir n° 1 de la planche). Ces cellules ressemblent morphologiquement aux courtes cellules malpighiennes d'autres graines.

On rencontre ensuite une ou deux autres couches constituées par des cellules aplaties et larges ( $6,3 \times 13,0 \mu$ ), à parois minces. Ces couches sont très fragiles et s'altèrent facilement pendant la préparation des coupes.

Dans une section transversale des cellules malpighiennes, le lumen est très petit (figure 2) et de forme souvent irrégulière et comprimée. Au-dessus de la ligne réfringente il est un peu plus large. Quelquefois on peut déceler deux ou trois canaux dans la même cellule. L'observation de nombreux canaux dans les sections longitudinales semble très souvent due à l'effet optique des bandes d'épaississement.

On a observé que les cellules malpighiennes deviennent plus courtes

Figure 2  
Section transversale des cellules  
malpighiennes chez *Gleditschia*  
(gr. 420 fois)



jusqu'aux deux pôles (région hilare et côté opposé), où la ligne réfringente n'est souvent plus visible.

Les cellules malpighiennes macérées montrent encore clairement la ligne réfringente (n° 2 de la planche). La membrane est toujours un peu gonflée à ce niveau. Au-dessous de ce gonflement, on observe un faible étranglement.

Chez *Hedysarum coronarium* (n° 3 de la planche), les cellules malpighiennes sont courtes (longueur  $28,3 \mu$ , largeur  $10,3 \mu$ ). A la partie supérieure, leur lumen est restreint par des bandes d'épaississement; vers le haut, il est souvent rempli des restes du cytoplasme. L'extrémité supérieure des cellules est traversée par la ligne réfringente (épaisse de  $1,6 \mu$ ). Au-dessus de la couche malpighienne se trouve une couche homogène et mince ( $0,5 \mu$ ). A la région hilare, les cellules malpighiennes sont surmontées par une couche de cellules de même grandeur, qui leur ressemblent morphologiquement, bien qu'elles n'aient pas de ligne réfringente (figure 3). Le reste du tégument présente les caractères normaux. Aucune différence n'est visible entre les graines dures et celles qui sont perméables.

## 2. Examen microchimique

Nous allons indiquer brièvement les couches ayant des caractères différents par des lettres, selon les indications de la planche (n° 1). Avec le chlorure de zinc iodé (réaction de la cellulose), les couches C et E se colorent nettement en bleu violet, tandis que la ligne réfringente reste très pâle, et les autres couches n'ont pas de couleur. Après un jour, les couches F et G se colorent et, après quelques semaines, la ligne réfringente D acquiert une coloration plus intense que le reste de la cellule malpighienne. Les couches A et B restent incolores. Avec l'acide sulfurique et l'iode on obtient une belle coloration bleue en C, F et G, et bleu

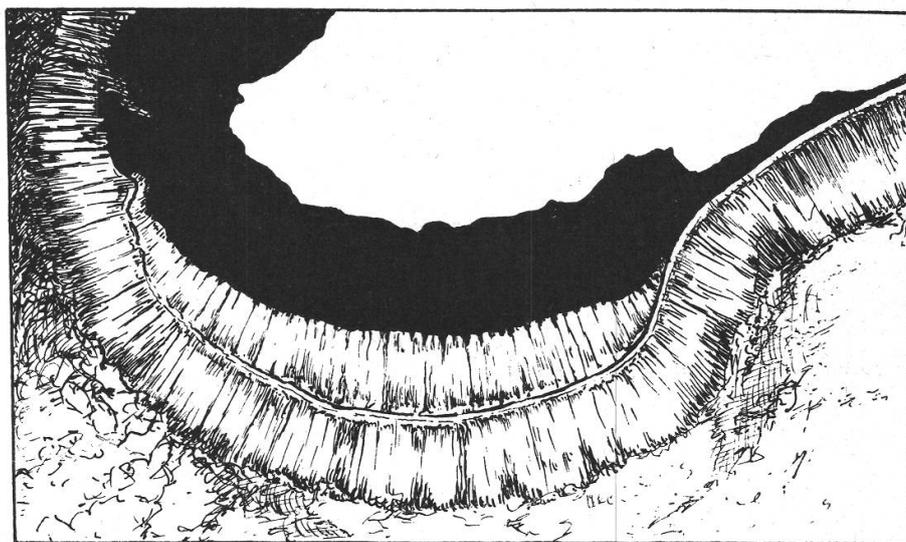


Figure 3

Coupe par usure chez *Hedysarum coronarium*. Région hilaire et couches imperméables au bleu de méthylène (gr. 340 fois)

grisâtre en E. La ligne D et les couches A et B se comportent comme précédemment.

Avec le rouge de ruthénium (réaction de la pectine), on obtient une couleur rouge vif en C, F et G. Les autres régions restent incolores, sauf des traces le long de la lamelle moyenne des cellules malpighiennes. Avec la phloroglucine, le sulfate d'aniline et le permanganate de potassium (réaction de la lignine), on n'a aucune coloration. La fuchsine toutefois colore très faiblement B, F et G; ce qui peut indiquer la présence de lignine et non pas de pectine, puisque C ne présente pas de couleur. Les réactions de la callose (benzoazurine et bleu d'aniline) sont négatives ainsi que celles de la cutine et de la subérine (Sudan III, rouge d'écarlat, violet de gentiane, potasse caustique). On obtient les mêmes résultats sur des coupes au microtome à main, qui n'ont pas été incluses dans du savon.

Après traitement des sections avec l'acide sulfurique concentré (n° 4 de la planche), les couches A<sub>2</sub>, B, C et E se dissolvent rapidement. Les couches F et G résistent plus longtemps. A la place de la ligne réfringente, on voit bientôt apparaître une série de points réfringents, qui forment les extrémités des bandes montant de la base de la cellule. La surface supérieure des cellules malpighiennes et la couche la plus externe de la graine (A<sub>1</sub>) résistent le plus longtemps.

Chez *Hedysarum coronarium*, tous les tissus contiennent de la cellulose, sauf la couche mince externe. La lignine peut être décelée uniquement dans la région des vaisseaux. La pectine est présente dans tout le tégument; elle est abondante dans la couche malpighienne. La surface de la graine est couverte d'une couche de cutine à peine visible.

### 3. Examen des propriétés optiques

#### a) Fluorescence

Au microscope en lumière ultraviolette, on observe dans les couches F et G une fluorescence bleu ciel, particulièrement forte vers le bord des cellules. En E, on a une fluorescence plus faible, renforcée le long des contours des cellules. En C, nous avons une fluorescence analogue à celle observée en E, mais moins forte. La couche B dans des coupes de 4  $\mu$  est vide dans la partie inférieure et les extrémités en calotte des cellules malpighiennes sont plus contrastées; la couche B devient graduellement fluorescente vers le haut et se confond avec la couche A<sub>2</sub>. La couche A<sub>1</sub> se distingue par une plus forte fluorescence. Dans les coupes de 10  $\mu$ , la couche B paraît traversée verticalement par une série de bandes serrées et sombres, tandis que toute la couche A est fortement fluorescente.

Chez *Hedysarum*, tout le tégument est fluorescent, surtout dans la couche basale. Les bandes d'épaississement des cellules malpighiennes tranchent sur le reste de la membrane.

La seule fluorescence révélée est la fluorescence bleu ciel, qui, d'après la bibliographie, paraît due à la présence de lignine ou de subérine.

#### b) Comportement à la lumière polarisée

Chez *Gleditschia*, le tégument sec (coupes par usure) présente dans la couche B, et à un degré moindre en A, une biréfringence positive par rapport à la surface de la graine (axe  $n\gamma$  parallèle à la surface). Les cellules malpighiennes ont une biréfringence opposée (axe  $n\gamma$  parallèle à l'axe de la cellule). Elles sont en extinction en position axiale, et leur structure est donc une structure de fibre. Dans les couches F et G, la biréfringence est du même signe que celles des cellules malpighiennes. On n'observe pas de changements en chauffant les préparations.

Dans les coupes au microtome (graines gonflées), les couches A et B sont optiquement isotropes.

Le dichroïsme, après traitement avec le chlorure de zinc iodé, est normal dans la couche E; il est très faible en C et surtout en F et G. On ne peut pas observer la couleur de la lignine par ce moyen.

La variation de la différence de phase, produite par la biréfringence dans la couche des cellules malpighiennes et dans la couche B de la graine de *Gleditschia*, a été mesurée à l'aide d'un compensateur de Sénarmont. Elle est représentée dans le diagramme de la figure 4.

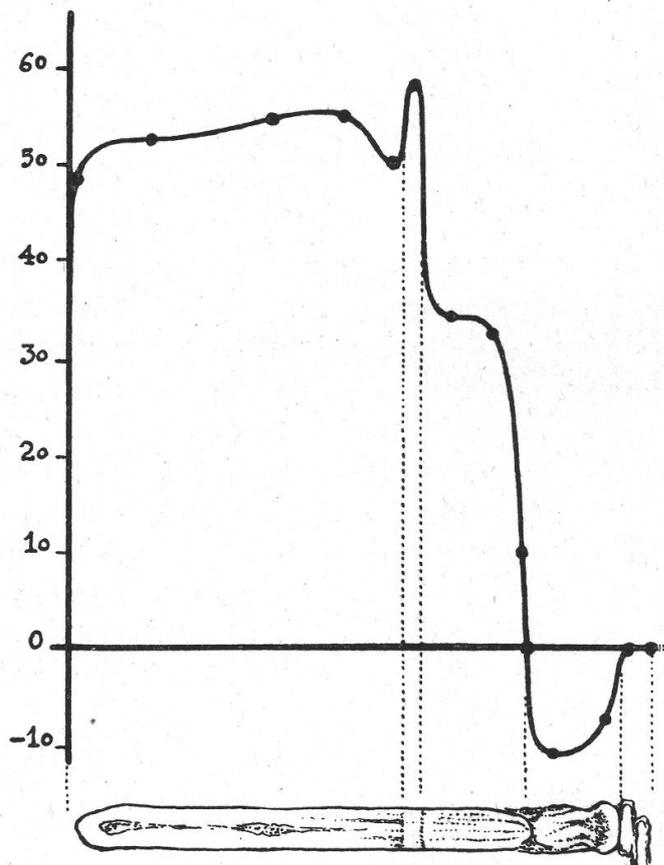


Figure 4  
Variation de la différence de phase dans les cellules malpighiennes et les couches qui les surmontent (gr. 350 fois). L'ordonnée indique l'angle de rotation de l'analyseur du compensateur de Sénarmont en degrés

Chez *Hedysarum*, la couche basale et les cellules malpighiennes se comportent comme chez *Gleditschia*. La couche mince externe est isotrope après gonflement. Le dichroïsme est normal dans toute la couche malpighienne.

#### c) *Index de réfraction*

L'examen des coupes à sec présente certaines difficultés. Pour cela nous avons déterminé les index de réfraction sur des cellules malpighiennes macérées de *Gleditschia*. L'index selon le grand axe est de  $n_{\gamma} = 1,573$  et selon le petit axe de  $n_{\alpha} = 1,529$ . La ligne claire présente les mêmes valeurs que le reste de la membrane.

#### 4. Examen au microscope électronique

Au microscope électronique (méthode des répliques et examen de cellules macérées), on peut observer la structure de la membrane des cellules malpighiennes. Celles-ci sont extérieurement parcourues par des reliefs longitudinaux. La cellulose présente des fibrilles disposées parallèlement à l'axe de la cellule. Le gonflement au niveau de la ligne réfringente rend difficile l'ombrage de cette zone; néanmoins, la planche (n° 5 a et 5 b) montre clairement que la structure de la cellulose est ici beaucoup plus compacte que dans le reste de la membrane, malgré le fort gonflement.

#### 5. Détermination de la couche imperméable

Des graines de *Gleditschia* furent laissées pendant une semaine dans une solution à 0,5 % de bleu de méthylène ou dans une solution diluée de rouge de ruthénium. Après avoir fait sécher ces graines à l'air, des coupes par usure furent pratiquées. Le n° 8 de la planche montre que les colorants n'entrent que dans la couche A; la couche B est déjà imperméable.

Pour déterminer l'épaisseur de la zone imperméable, nous avons meulé un côté des graines pendant une seconde environ. Après les avoir laissées pendant une semaine dans l'eau, nous avons trouvé plusieurs graines dures. Le n° 7 de la planche montre une section à la meule d'une de ces graines au niveau de la surface précédemment usée. Bien que les cellules malpighiennes aient été sectionnées jusqu'au-dessous de la ligne claire, on peut observer que le tégument est resté imperméable. Dans des coupes de graines gonflées, la couche des cellules malpighiennes se présentait toujours complètement usée.

Voulant ensuite observer l'importance des nombreuses fentes visibles à l'œil nu, à la surface de la graine, nous avons exécuté une réplique de surface d'une graine meulée sur une de ses faces. La partie supérieure du n° 6 de la planche montre le réseau des fentes à la surface intacte. Dans la partie inférieure, on voit la pénétration des fentes dans le tégument. Malgré ce fait, le tégument est imperméable.

Nous avons ensuite exécuté des coupes par usure sur des graines dures de *Hedysarum*, préalablement laissées dans une solution de bleu de méthylène. On a pu observer que l'eau ne rentre que dans la couche mince externe; dans quelques graines dures d'un autre échantillon, cette couche n'absorbe pas d'eau. Les cellules malpighiennes et celles qui les surmontent à la région hilare sont imperméables (figure 3).

#### Discussion et conclusion

Chez *Gleditschia triacanthos*, la membrane des cellules malpighiennes est constituée par une charpente cellulosique. D'après l'examen au micros-

cope polarisant et électronique, il résulte que cette cellulose est constituée par des fibrilles parallèles à l'axe de la cellule. Au-dessus de la ligne réfringente, la membrane contient de la pectine. Une substance incrustante, qui se distingue par sa fluorescence, est présente dans presque tout le tégument. On ne peut cependant pas déceler avec certitude de lignine, de cutine, de subérine et de callose par les réactions microchimiques.

La ligne réfringente est entièrement constituée de cellulose. A ce niveau, cette substance présente une structure plus compacte, ainsi que le démontrent les différences de vitesse et d'intensité de réaction aux colorants, le gonflement après macération et l'observation au microscope électronique. La luminosité de la ligne réfringente est due à l'absence d'espaces submicroscopiques de la cellulose. La différence de phase en lumière polarisée est moindre de part et d'autre de cette ligne, et les cellules macérées sont étranglées au-dessous d'elle. Dans le n° 4 de la planche, cet endroit correspond à la jonction des points de la ligne réfringente avec les bandes qui s'étendent vers le bas.

Les cellules malpighiennes sont surmontées de deux ou trois couches cellulaires. La cellulose n'a pas pu être mise en évidence dans ces cellules. Leur comportement aux colorants rappelle la couche mucillagineuse décrite par M a t t i r o l o et B u s c a g l i o n i ; les résultats de l'examen en lumière polarisée (signe de la biréfringence et isotropie après le gonflement) correspondent à ceux que F a u c o n n e t a obtenus dans les cellules à mucilage du lin. Il ne s'agirait pas de cutine, parce que celle-ci a une biréfringence opposée. L'imperméabilité des cellules malpighiennes et de la première couche qui les surmonte semble due à des causes similaires. La même substance fluorescente des cellules malpighiennes est présente dans toutes les couches.

La graine n'a pas de cuticule. La zone imperméable commence par la couche surmontant les cellules malpighiennes; elle s'étend dans ces cellules au-dessous de la ligne réfringente, probablement dans toute leur longueur. Il est à noter que les cellules des deux couches cellulaires imperméables se ressemblent morphologiquement.

La ligne réfringente perd toute importance à l'égard de l'imperméabilité.

La pectine et la substance fluorescente, que nous avons pu mettre en évidence, se trouvent soit dans la couche basale hydrophile, soit dans les cellules malpighiennes imperméables.

Les théories fondées sur l'existence d'une couche de substance hydrophobe (cutine, subérine) semblent donc erronées. La cause de l'imperméabilité ne semble pouvoir dépendre que de l'état des substances normalement présentes dans le tégument.

Chez *Hedysarum coronarium*, la couche malpighienne n'est géné-

ralement pas recouverte d'autres cellules. Cependant elle est surmontée à la région hilare d'une couche de cellules imperméables, qui lui ressemblent morphologiquement, mais qui ne présentent pas de ligne réfringente. La pectine se trouve dans tout le tégument, sauf dans la couche mince externe qui le recouvre. Cette dernière, dont on ne peut pas déterminer la composition chimique, est la seule zone perméable, bien qu'elle soit recouverte de cutine. Les autres caractères du tégument sont analogues à ceux de *Gleditschia*.

Il ne semblerait pas vraisemblable d'admettre que la cellulose puisse jouer un rôle dans l'imperméabilité, puisqu'elle a une structure fibrillaire. Cependant la ligne réfringente de *Gleditschia* ne révèle pas d'autres substances; il faudrait admettre que son imperméabilité soit due à sa compacité.

Le rôle de la pectine semble inexistant, car chez *Gleditschia* elle se rencontre seulement dans une zone partielle de la région imperméable.

La substance fluorescente, par sa distribution étendue, pourrait être en relation avec l'imperméabilité. Sa nature chimique n'a pas pu être élucidée. On pourrait supposer, d'après les réactions microchimiques, qu'il s'agisse de traces de lignine plutôt que de subérine.

La lignine, selon quelques auteurs, peut avoir des compositions différentes. Ceruti a démontré que cette substance extraite de différentes sources a une hygroscopicité différente (vitesse et quantité finale de l'absorption), ce qui pourrait expliquer son rôle dans le tégument des graines dures.

\* \* \*

Pour terminer, nous voudrions remercier bien vivement M. le professeur A. Frey-Wyssling, directeur de l'Institut de physiologie végétale de l'École polytechnique fédérale de Zurich, qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et grâce à qui ce travail a été rendu possible.

---

#### Bibliographie

- A m b r o n n , H., et F r e y , A., 1926. Das Polarisationsmikroskop. Akad. Verlagsges. Leipzig.
- B e h r e n s , H., 1934. Beiträge zur Kenntnis der Hartschaligkeit von Leguminosensamen. Diss. Univ. Hamburg, 66; Rf. dans Herbage Abstracts, 278, 1935.
- C e r u t i , A., 1947. Su l'idratazione della lignina in rapporto alla sua specificità. Nuovo Gior. Bot. Ital., n. s., LIV, 371—372.
- D ' I p p o l i t o , G., 1905. Sulle cause che impediscono la germinazione dei semi duri nelle papilionacee. Le Staz. Sper. Agr. Ital., 38, 114.
- E a m e s , A. I., et M a c D a n i e l s , L. H., 1947. An introduction to plant anatomy. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York and London, 2<sup>e</sup> éd., 369.
- F a u c o n n e t , L., 1948. Texture submicroscopique du mucilage de la graine de lin. Pharm. Acta Helv., 23, 101—108.

- Frémy, E., et Urbain, 1882. Etudes chimiques sur le squelette des végétaux. I et II, C. R. Acad. Scien., Paris, **XCIII**, 926—931, 1881; **XCIV**, 108, 1882; Jour. Pharm. et Ch., 113, 1882; Rf. dans Bot. Zent., **10**, 3—5 et 355.
- Frey-Wyssling, A., 1947. Das Fluoreszenzmikroskop im Dienste der Pflanzenphysiologie. Vierteljahrsschr. der Naturf. Ges. Zürich, **XCII**, 188—194.
- 1949. Formgestaltung im sublichtmikroskopischen Gebiet. Ber. der Schweiz. Bot. Ges., **59**, 5—22.
- et Mühlethaler, K., 1949. Über den Feinbau der Zellwand von Wurzelhaaren. Mikroskopie, **4**, 257—266.
- Gadd, I., 1938. Undersökninger rörande groning av hardskaligt baljväxtfrö och dettas bruksvärde. Beret. fra N. I. F. s. Congres i Upsala, 84—92.
- Gola, G., 1905. Ricerche sulla biologia e sulla fisiologia dei semi a tegumento impermeabile. Mem. R. Accad. Sci. Torino, s. II, **LV**, 237.
- Harz, C. D., 1885. Verholzungen höherer Pflanzen, speziell über das Vorkommen von Lignin in Samenschalen. Bot. Zent., **XXIV**, 21—31, 59—61, 88—92.
- Hegetschweiler, R., 1949. Über den Feinbau des Seidenfibroins. Promot. der ETH, 15.
- Küster, E., 1935. Die Pflanzenzelle, 484. G. Fischer, Jena.
- Laboureur, P.-L., 1949. Nouvelle technique de coupe mince d'organes lignifiés. Bull. Soc. Bot. de France, **96**, 99.
- Mattirolo, O., 1887. Sullo sviluppo e sulla natura dei tegumenti seminali nelle leguminose. Malpighia, **I**, 37.
- 1885. La linea lucida nelle cellule malpighiane degli integumenti seminali. Mem. R. Acc. Sci. Torino, s. II, **XXXVII**, 1—30, 1885; Rf. dans Bot. Zent., **23**, 136.
- et Buscaglioni, L., 1889. Sulla struttura degli spazi intercellulari nei tegumenti seminali delle papilionacee. Malpighia, **III**, 143.
- — 1890. Ricerche anatomo-fisiologiche sui tegumenti seminali delle papilionacee. Atti R. Acc. Sci. Torino, **XXIV**, 1889; Rf. dans Bot. Zent., **42**, 21.
- Metzner, P., 1930. Über das optische Verhalten der Pflanzengewebe in langwelligem ultraviolettem Licht. Planta, **10**, 281—313.
- Molisch, H., 1921. Mikrochemie der Pflanze. 2<sup>e</sup> éd. G. Fischer, Jena.
- 1921. Pflanzenphysiologie als Theorie der Gärtnerei, 290. G. Fischer, Jena.
- Netolitzky, F., 1926. Anatomie der Angiospermensamen; Linsbauer, K. Handbuch der Pflanzenanatomie, **X**, 17, 39—40, 161—170, Gebr. Bornträger, Berlin.
- Pammel, L. H., 1887. On the structure of the testa of several leguminous seeds. Bull. Tor. Bot. Club, **8**, 1886; Rf. dans Bot. Zent., **XXXII**, 362.
- Prinzi, D. G., 1932. Il meccanismo del riposo nei semi ed il suo significato. L'Italia Agr., **69**, 5.
- Rancken, Märta, 1937. Der Einfluß von Feuchtigkeit und Temperatur auf die harten Kleesamen während der Aufbewahrungszeit. Mitt. Int. Ver. Samenk., **9**, 263—271.
- Rodriguez, C., 1948. Aspectos opticos en el desarrollo de semillas de *Gleditsia triacanthos* L. Ann. Inst. Esp. Edaf. Ecol. Fisiol. Veg., **VII**, 201—214.
- Sass, J. E., 1940. Elements of botanical microtechnic. 1<sup>re</sup> éd., 99. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York and London.
- Schneider, H., et Zimmermann, A., 1922. Die botanische Mikrotechnik. 2<sup>e</sup> éd. G. Fischer, Jena.
- Tschirch, A., 1889. Angewandte Pflanzenanatomie, I. Urban & Schwarzenberg, Wien und Leipzig.
- Tunmann, O., 1913. Pflanzenmikrochemie, 558—559. Gebr. Bornträger, Berlin.
- Watson, D. P., 1948. Structure of the testa and its relation to germination in the Papilionaceae, tribes Trifolieae and Loteae. Ann. of Botany, n. s., **XII**, 385—409.