

Méthode spéciale de coloration es mousses

Objekttyp: **Chapter**

Zeitschrift: **Mémoires de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**

Band (Jahr): **7 (1941-1943)**

Heft 2

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Méthode appliquée au miel:

Il est généralement inutile de faire des préparations permanentes de miel. Elles peuvent cependant présenter un certain intérêt dans des cas spéciaux¹.

Rappelons que, dans le miel, les grains de pollen sont toujours un peu gonflés. Le collage à l'albumine, dans la plupart des cas, n'est plus nécessaire, le sucre se chargeant d'emprisonner les grains.

La meilleure méthode de préparation nous paraît être la suivante:

1 à 2 cc. de miel sont agités dans une éprouvette avec 10 à 15 cc. d'eau distillée. Le sirop ainsi obtenu est centrifugé pendant 10 minutes environ. On décante et, au moyen d'une pipette, on recueille le culot dont une goutte est déposée sur une lame chauffée à la plaque chauffante pour évaporer l'excès de liquide².

On traite sur lame 3 fois à l'alcool à 95° pour dégraisser les grains. On évapore à sec, et on colore sur lame par une ou deux gouttes de colorant. On lave à l'eau distillée, puis encore 3 fois à l'alcool. Après évaporation à sec, on monte au baume.

N. B. — Les méthodes 1 et 2 ont aussi été appliquées avec succès aux spores des Cryptogames vasculaires et des Mousses (Equisetales, Filicales, Sphagnales, etc.).

Bibliographie:

L. AMBRUSTER et G. OENIKE, Die Pollenformen, Bücherei f. Bienenkunde, Band X, Neumünster, 1929.

Biological Abstracts 1937, n° 7775, Coloration du pollen.

A. DAUFRESNES, *loc. cit.*, p. 566.

V. JENTYS SZAFER, Structure des membranes du pollen, *Bull. Acad. Polonaise*, Cracovie, 1928.

LANGERON, *loc. cit.*, p. 606 et 1151 (chloralphénol).

L. MANGIN, Observations sur le développement du pollen, et Observations sur le grain de pollen mûr, XXXVI. *Bull. Soc. Bot. France*, 1889.

ZANDER, Beiträge zur Herkunftsbestimmung bei Honig, 1 et 2, Berlin, 1935, et Leipzig, 1937.

CHAPITRE XI : Méthode spéciale de coloration des mousses.

A propos de la lignine (p. 128), nous avons déjà parlé de la question des mousses. Il existe de très nombreuses opinions à ce sujet. F. CHODAT et R. CORTESI, dans leur travail « Sur la coloration des membranes des mousses », disent ceci:

¹ Pour l'apiculteur, par exemple, collection comparative des récoltes des abeilles d'une même ruche suivant les années.

² Si le nombre de grains a une importance, on ne devra évidemment comparer que des préparations ayant un même nombre de gouttes!!

« Les histologistes n'ont pas tardé à constater que la mise en évidence de la cellulose présente de fréquentes irrégularités... D'autre part, aucun histologiste n'a réussi à mettre en évidence la lignine chez les mousses... Or, si les histologistes ont si souvent échoué dans la mise en évidence de la cellulose des membranes des mousses, l'existence de ce corps a pourtant été prouvée par plusieurs analyses chimiques. Ainsi WAKSMAN¹ y a dosé non seulement la cellulose, mais même la lignine » (*loc. cit.*, p. 58 et 60).

Dans le traité de C. BONNIER et LECLERC DU SABLON, nous trouvons fréquemment le terme de « cellules lignifiées ».

De même A. PASCHER parle de « Holzkörper » (*loc. cit.*, p. 5).

W. LORCH, dans son « Anatomie der Laubmoose », emploie les expressions: « Holzfasern, Holzkörper, Holzstoff et Holz-zellen ». De ce même ouvrage, nous tirons encore le passage suivant: « Im Gegensatz hierzu steht eine Angabe SCHELLENBERGS, der bei *Polytrichum* das Vorhandensein von Lignin festgestellt haben will. LINSBAUER hat die Befunde SCHELLENBERGS einer erneuten Prüfung unterzogen, und ist zu dem Resultate gelangt, dass von einer Verholzung der Mooszellmembranen keine Rede sein kann. »

La présence ou l'absence de lignine chez les mousses est donc controversée. On pourra lire encore différentes opinions à ce sujet, citées par C. VAN WISSELINGH (*loc. cit.*, p. 132-134) au chapitre intitulé « Vorkommen der Verholzung ».

La question ainsi posée présentait donc un certain intérêt du point de vue histologique, en relation avec notre étude des colorants.

Nous avons choisi comme matériel d'expérience: des thalles de *Marchantia polymorpha* (Hepaticae); des feuilles et tiges feuillées de *Mnium* sp. (Bryales); des feuilles, tiges feuillées et soies de sporogones de *Polytrichum commune* (Bryales); des feuilles et tiges feuillées de *Sphagnum squarrosum* (Sphagnales).

Résultats du réactif-test:

— thalle de *Marchantia*:

L'épiderme inférieur et les rhizoïdes sont brunâtres (?).

Les cellules du sclérenchyme (selon BONNIER) sont jaunâtres, peu caractéristiques.

¹ WAKSMAN trouve 7% de lignine dans les parties supérieures et 19% dans les parties inférieures de la tige feuillée de *Sphagnum*. Cette méthode de dosage comprend sous le nom de lignine toutes les substances non hydrolysables ou facilement oxydées.

Un dosage des groupes méthoxyles donne des résultats bien inférieurs, justifiant dans une certaine mesure l'incertitude au sujet de la présence ou de l'absence de lignine des mousses. G. KLEIN signale pour 17% de lignine dans le *Sphagnum* 0,6% seulement de groupes méthoxyles.

Les cellules à huile, assez nombreuses dans le parenchyme, présentent une coloration nette rouge orangé.

L'épiderme supérieur et le parenchyme sous-jacent sont brunâtres, mais cependant plus pâles que l'épiderme inférieur.

— *plante de Mnium* :

Les feuilles, constituées d'une seule assise cellulaire, prennent une coloration orangée, caractéristique des matières grasses, qui semblent exister ici en très forte quantité. La pseudo-nervure médiane, formée d'un amas de cellules conductrices, présente la même coloration.

Dans la tige feuillée, l'assise superficielle, munie de rhizoïdes, est brunâtre (?); le tissu de soutien, formé de cellules à parois épaissies, à cavités intérieures petites, est brun jaune. Le parenchyme à grandes cellules est brunâtre, et contient quelques grains d'amidon (bleu violet). Quant au massif central, formé de cellules allongées, étroites, à parois minces, représentant le tissu conducteur de l'eau, il est également brun.

— *Polytrichum commune* :

Pour la tige feuillée, nous trouvons des résultats analogues: tissu de soutien extérieur brun, parenchyme cortical brunâtre, pseudopéricycle et tissu conducteur central jaune brun.

La feuille présente plusieurs assises de cellules au milieu. La nervure médiane est ainsi assez marquée, et présente à la face inférieure une masse jaune brun de cellules à parois épaissies semblables à des fibres. Le pédicelle (soie du sporogone) montre une écorce de plusieurs rangées de cellules fortement renforcées (tissu de soutien); le réactif-test colore ces cellules en brun jaune vif. Quant au parenchyme médullaire, à parois minces, s'il n'a pas complètement disparu par vieillissement, il est à peine teinté (blanc crème).

— *Sphagnum squarrosum* :

Dans ce cas, aucune coloration brunâtre n'apparaît.

L'assise superficielle de la tige feuillée est blanchâtre, et le tissu scléreux apparaît comme un anneau jaune d'or très net. Le parenchyme est blanc crème, comme les tissus celluloseux des plantes supérieures. Les feuilles de *Sphagnum* présentent une coloration orangée (matières grasses) et ne paraissent pas contenir de tissu de soutien.

De ces expériences préliminaires, on ne peut tirer aucune conclusion certaine quant à la présence de lignine chez ces mousses. On peut cependant prévoir sa présence dans plusieurs cas (sclérenchyme de *Polytrichum* et de *Sphagnum*) vérifiés par des essais positifs à la *phloroglucine chlorhydrique*.

Les cellules lignifiées, s'il s'en trouve, semblent faire partie du tissu de soutien proprement dit plutôt que du tissu conducteur.

La coloration brunâtre obtenue dans trois des cas cités, ne correspond exactement à aucune réaction connue du réactif-test. Elle n'a jamais été observée chez les Phanérogames, ni chez les Cryptogames vasculaires. Elle est due probablement à une imprégnation des membranes par une ou des substances spécifiques des mousses, par exemple l'acide dicranotannique signalé par CZAPEK.

Un nouvel essai du réactif-test, après le traitement à l'éther/hypochlorite, donne encore la coloration brune de ces tissus. Le traitement des coupes par HCl (voir traitement préalable des coupes, cas spéciaux) atténue la coloration. Malgré des essais de prolongation du traitement, nous ne sommes pas parvenue à la faire disparaître totalement.

Cette réaction colorée, si elle ne correspond absolument à aucune de celles obtenues chez les Phanérogames, se rapproche cependant de celle des tanins en présence du réactif-test. Elle semble due à l'action du Fe Cl_3 de ce réactif. Pour nous en assurer, nous avons essayé l'action des réactifs des tanins cités par LANGERON, (*loc. cit.*, p. 1158): Fe Cl_3 seul donne une coloration brun noir, et $\text{K}_2 \text{Cr}_2 \text{O}_7$ brune; KOH produit une coloration rouge très nette, tandis que le *bleu de méthylène* donne une réaction verdâtre; le réactif de Broemer donne un précipité jaunâtre pas très net, et la caféine un précipité blanchâtre.

On peut donc conclure à la présence de tanoïdes dans les mousses étudiées, sauf chez *Sphagnum*.

Coloration:

Nous avons essayé sur ces mousses différentes méthodes de coloration, en procédant de la manière suivante: les mousses ont été fixées¹, et les coupes faites au microtome à main. Pour cela, les tiges feuillées et les pédicelles furent introduits dans une moelle de sureau sèche du format du microtome et trouée au moyen d'une aiguille. Les feuilles étaient prises entières. Le matériel fut ensuite soumis au traitement mixte à l'éther/hypochlorite préconisé par CHODAT et CORTESI. Les coupes de tiges feuillées, de pédicelles et les feuilles furent plongées dans un bain d'éther ordinaire pendant 2 à 5 heures, puis dans un bain de NaClO pendant une demi-heure environ. Les membranes sont ainsi dégraissées, et le contenu cellulaire éliminé. La durée du traitement doit être prolongée (le bain d'éther surtout) pour les mousses vieilles, les membranes cellulaires s'imprégnant de lipoides au cours de la vie de la plante. Après ce traitement, et un rapide passage à l'acide acétique pour neutraliser toute

¹ Voir chap. I, Matériel étudié.

trace d'alcali, les coupes, lavées à l'eau distillée, sont prêtes à la coloration par la méthode ordinaire. Il faut cependant noter que seules les colorations les plus sensibles à la lignine ont été essayées, vu la très petite quantité de cette substance supposée dans nos minuscules coupes. Les colorants furent donc choisis parmi ceux qui avaient donné de bons résultats en solution très diluée, et ceux utilisés avec succès pour le pollen, par exemple :

le *bleu de méthylène*, la *chrysoïdine*, les *verts d'iode*, ou *malachite*, les *violetts cristal*, de *gentiane*, de *méthyle*, tous colorants basiques, utilisés pour les quatre cas dans les colorations doubles suivantes :

Bleu de méthylène/Carmin,
Chrysoïdine/Hémalun ou Rouge Congo,
Vert d'iode ou *Lumière*/Carmin ou Rouge Congo,
Vert malachite/Carmin, Hémalun ou Rouge Congo,
Violet cristal/Rouge Congo.

En coloration simple, nous avons essayé l'*hématoxyline ferrique* ou *cuivrique*.

— *thalle de Marchantia* :

Dans tous les cas de coloration, les cellules épidermiques et les rhizoïdes restent brunâtres. Aucune lignification n'apparaît nettement dans les colorations doubles.

L'essai au *bleu de méthylène* donne une coloration verdâtre à certaines parois cellulaires, mais cette réaction n'est pas concluante puisque les tanins, qui donnent aussi cette réaction, n'ont pu être complètement éliminés par le traitement.

Le parenchyme donne une coloration cellulosique nette aussi bien au *carmin* qu'au *rouge Congo*.

— *plante de Mnium* :

Les feuilles, débarrassées des matières grasses par le traitement préalable, donnent une bonne coloration simple à l'*hématoxyline* sur mordant de fer ou de cuivre. Aucun colorant basique n'a donné les réactions du bois; en coloration double, le colorant cellulosique seul agit, même dans la région de la nervure.

La tige feuillée donne aussi des réactions cellulosiques nettement marquées au *carmin*, à l'*hémalun* et au *rouge Congo*. Malgré un traitement prolongé à l'éther/hypochlorite, puis à l'acide chlorhydrique, l'écorce et les rhizoïdes sont brunâtres.

Dans ce cas encore, aucune coloration caractéristique de la lignine n'a pu être obtenue.

— *Polytrichum commune* :

C'est sur cette espèce que nous avons tenté le plus grand nombre de colorations; nous avons essayé tous les colorants cités, et en plus quelques autres, comme le *violet Dahlia* ou de *méthyle* avec le *rouge Congo*, par exemple; nous voulions nous assurer que

les colorations des membranes lignifiées aperçues n'étaient pas fortuites, mais se confirmaient.

Les feuilles de *Polytrichum* présentent une structure plus compliquée que celles de *Mnium* par exemple. Vers la nervure médiane, nous trouvons: la face supérieure couverte de lamelles; à la face supérieure et inférieure de la feuille, deux bandes d'hydroïdes sont suivies, en allant vers l'intérieur, de deux lignées de cellules à parois épaissies (stéréome), séparées par un parenchyme. A la coloration, il est difficile de distinguer les hydroïdes du stéréome; dans la coupe transversale de feuille, on voit donc deux bandes, l'une supérieure, l'autre inférieure, fortement colorées par les colorants du bois, séparées par une ou deux lignées de cellules à parois cellululosiques.

Au *bleu de méthylène*, la coupe est complètement verdâtre, probablement parce que les tanoïdes n'ont pas été complètement éliminés. D'autre part, le *réactif genevois* donne une mauvaise différenciation. Les détails les mieux visibles se trouvent dans les colorations au *carmin* en contraste avec les verts.

La tige feuillée de *Polytrichum* montre aussi une structure assez complexe: le centre est formé d'éléments conducteurs, *hydroïdes à parois épaisses* au milieu, qu'entoure un anneau d'*hydroïdes à parois minces*. A ce système conducteur central fait suite un *pseudopéricycle* plus ou moins distinct, qui peut contenir de l'amidon ou de l'huile, et semble avoir un rôle protecteur. Suivant les auteurs, ce tissu porte différents noms: Endodermis, rudimentäres Perizykel, Stärkescheide, Schutzscheide, Leptomring, Hydromscheide (voir nomenclature W. LORCH, *loc. cit.*, p. 62 et 72, et C. SCHULZ, *loc. cit.*, p. 29). Autour de cette espèce de cylindre central (Zentralstrang) se trouve une écorce (Rinde) formée elle aussi de deux zones: un *parenchyme cortical* présentant des traces foliaires (Blattspuren) plus ou moins nombreuses et distinctes selon l'âge de la plante et le niveau de la coupe; et un *sclérenchyme cortical* (Epidermoïdalschicht) à membranes cellulaires épaissies.

Les hydroïdes à parois épaisses prennent plus ou moins distinctement les colorants du bois. Les hydroïdes à parois minces prennent très nettement les colorants de la cellulose, et montrent, à première vue, un aspect semblable à celui d'un liber annulaire. Le pseudopéricycle, qui se présente sous une forme irrégulière, plus ou moins bien définie suivant les coupes, variable avec l'âge de la plante et le niveau de la coupe, est constitué de petites cellules à parois minces qui prennent soit les colorants cellululosiques, soit, légèrement, les colorants du bois. Cette différence est probablement due à des tissus plus ou moins âgés. Le parenchyme cortical fixe nettement les colorants de la cellulose; les traces foliaires y forment des amas plus ou moins distincts, légèrement colorés par les colorants de la lignine. Le sclérenchyme cortical, formé de cellules à parois fortement épaissies, prend les colorants

de la lignine. Cette coloration n'est cependant pas très franche, car elle est faite de la superposition du colorant à la coloration brune initiale de ces membranes.

Le *bleu de méthylène* donne de nouveau ici une coloration peu sûre, qui est due probablement aux tanoïdes.

La *chrysoïdine/hémalun* colore le centre en brun orangé, comme le bois; l'anneau d'hydroïdes à parois minces en violet rose, comme le liber; le pseudopéricycle devient jaunâtre et peu différencié, le parenchyme violet et le sclérenchyme brun rouge.

Avec le *vert d'iode* (ou *vert Lumière*)/*carmin*, le centre est vert, le premier anneau rose; le pseudopéricycle apparaît légèrement verdâtre; le parenchyme est brun rose, et le sclérenchyme va du vert brun au vert olive.

Avec le *vert d'iode/rouge Congo*, l'anneau d'hydroïdes à parois minces atteint son maximum de netteté, et ressort en rose vif dans la coupe.

Avec le *vert malachite/hémalun*, les hydroïdes du centre sont vert jaune, tandis que les cellules du tissu de soutien extérieur sont vert bleu. Cette différence fait penser à d'autres cas analogues, observés chez des Phanérogames, où les vaisseaux du bois et les fibres présentaient des nuances de coloration (cf. colorants des tissus lignifiés, chap. VIII).

La coloration *violet cristal/rouge Congo* nous donna un résultat intéressant: dans une série de coupes d'une même tige, le centre devint bleu, le premier anneau rose vif, et le pseudopéricycle, très irrégulier, présenta une teinte brunâtre. Le parenchyme se colora en rose brun, et le tissu de soutien extérieur en bleu, avec reflets brun très foncé. Il semble que nous avons affaire ici à une tige âgée, dont les tissus seraient plus fortement imprégnés de tanoïdes, exception faite des hydroïdes à parois minces.

L'âge de la coupe paraît devoir constituer un facteur important, qui permet au massif central de présenter nettement, ou, au contraire, très faiblement, les réactions de la lignine. Le pseudopéricycle, par contre, donnera quelquefois les colorations de la cellulose, et plus souvent celles de la lignine. — Le parenchyme, malgré un traitement préalable prolongé, reste souvent brunâtre (tanoïdes?) et cette teinte fondamentale influence l'aspect de la coloration. — Le tissu de soutien extérieur peut, lui aussi, varier; s'il est très fortement épaissi, il forme une bande de couleur foncée, que les colorants de la lignine accentuent encore, au point qu'on ne peut presque plus distinguer les cellules. Cependant, dans les tiges jeunes, les contours cellulaires restent bien visibles, et sont colorés par les verts et les violets (colorants des tissus lignifiés).

Des essais de coloration analogues ont été tentés sur des coupes de pédicelles (soies de sporogones). Ces pédicelles présentent, sous l'action de tous les colorants du bois, une large bande extérieure

fortement lignifiée (tissu de soutien). Il semble que, là au moins, la présence de lignine soit incontestable. Quant à la partie centrale du pédicelle, elle est, dans la plupart des cas, totalement disparue. Si elle a subsisté, elle montre des réactions cellulosiques nettement caractérisées. La coloration au *réactif genevois* donne, en quelque sorte, le degré de lignification du tissu de soutien: dans les pédicelles jeunes, le tissu est jaune orangé; dans les plus âgés, il est brun. De nouveau on obtient les meilleurs contrastes de colorants avec les *verts/carmin*, ou le *violet cristal/rouge Congo*.

— *Sphagnum squarrosum*:

Les feuilles ne présentent aucune des réactions colorées de la lignine. Après traitement, elles donnent toutes les réactions des membranes cellulosiques.

La constitution de la tige est la suivante: une coupe transversale nous montre un hyaloderme extérieur formé de deux à trois couches de grosses cellules (rappelant le velamen des racines épiphytes), un stéréome, tissu formé de cellules à parois épaissies (*fälschlich Holzkörper*) et un tissu de cellules banales (*Grundgewebe, fälschlich Mark*) (nomenclature selon W. LORCH, *loc. cit.*, p. 50).

Ces différents tissus ont des réactions variables suivant l'âge de la tige étudiée¹. Dans les tiges jeunes, les réactions des colorants de la cellulose peuvent seules être obtenues, bien que le stéréome annulaire présente déjà un épaississement très net des membranes. Dans les tiges plus âgées, cet anneau donne nettement les réactions de la lignine (*verts/carmin* et *violet cristal/rouge Congo*).

Dans la partie inférieure de la tige de *Sphagnum* (partie la plus vieille), l'anneau n'existe plus; il a été rompu, et forme quatre ou cinq paquets de fibres, séparés les uns des autres. Ces amas fibreux présentent les réactions de la lignine encore plus nettement que l'anneau des tiges plus jeunes. Avec les *verts/carmin*, ces paquets fibreux ressortent nettement en vert bleu sur le fond rose violet de la cellulose. La *chrysoïdine* ou le *violet cristal* les fait ressortir en brun orangé ou en bleu vif sur le fond corail obtenu avec le *rouge Congo*.

Des coupes longitudinales de tiges feuillées montrent aussi nettement ces mêmes colorations.

¹ Voir note au début du chapitre.