Etude Comparée de la Formation de l'Exine au Cours de la Microsporogénèse Chez une Gymnosperme (*Taxus baccata*) et une Préphanérogame (*Ginkgo biloba*)

René Rohr

Laboratoire de Botanique II, Université de Nancy I, Case officielle n° 140,
54037 Nancy-Cedex, France

Reçu le 9 Septembre 1975

La mise en place autour du grain de pollen des différentes formations qui constituent le sporoderme fait appel à des processus complexes et variés dont l'interprétation est difficile.

La paroi sporale des plantes ovulées est constituée de deux parties: l'*exine* et l'*intine*.

—l'*exine* est constituée d'un polymère de caroténoïdes: la sporopollénine dont la formule chimique est connue pour certaines espèces (Brooks and Shaw 1971). Son origine est toutefois très discutée. L'*exine* est formée de deux parties: *sexine* (composée du tectum et des bacules) et *nexine* (Erdtman 1966)

—l'*intine*, qui double intérieurement l'*exine*, est pectocellulosique (Sitte 1953)

Les premiers indices du dépôt de l'*exine* se manifestent par l'apparition d'une matrice fibrillaire, la primexine, entre le plasmalemme et la paroi spéciale. De nature cellulosique (Eslop-Harrison 1968), la primexine pourrait être produite par les dictyosomes (Dickinson 1970, Echlin and Gowin 1968, Lepouse 1970, Willemse 1971).

La sporollénine se dépose ensuite pour former d'abord le tectum et les bacules, ensuite la nexine, composée de plusieurs couches

La plupart de nos connaissances en ce domaine ont été acquises à la suite de très nombreux travaux effectués avec le pollen des Angiospermes; peu d'études ont été faites avec celui des Préspermaphytes et des Gymnospermes.

Dans le présent article, nous nous proposons de préciser les principales étapes de l'ontogénie de la paroi sporale du pollen chez *Taxus baccata* L. (Taxacées) et *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoacées).

Chez *Taxus*, la paroi du grain de pollen est inaperturée et diffère beaucoup de celle de *Ginkgo*, plus complexe et qui possède une zone germinative déterminant l'endroit où se fait l'émergence pollinique.

Matériel et méthodes

Les cônes mâles de *Ginkgo biloba* et *Taxus baccata* ont été prélevés et fixés régulièrement depuis la méiose jusqu'à l'anthèse afin d'étudier l'ontogénie de la paroi sporale.

La présence de substances hydrophobes dans les microsporophylles chez ces deux espèces, complique considérablement les difficultés rencontrées lors de la fixation et de l'inclusion pour l'étude au microscope électronique. Deux techniques nous ont permis de pallier cette difficulté:

—chaque fois que le contenu des sporanges formait une masse suffisamment cohérente, nous avons fixé et inclus directement le contenu des sporanges écrasés.

—dans les autres cas, les sporophylles ont été également fixées, mais après section de leurs deux extrémités, afin de permettre une meilleure pénétration des solutions fixatrices, contrastantes et des résines d'inclusion.

—*Fixations*: elles sont toutes réalisées à bases température (0–4°C). Il s'agit ou bien d'une fixation d'une heure par le tétroxyde d'osmium à 2% dans le tampon véronal pH 7,2 précédée ou non d'une fixation par le glutaraldéhyde à 2,5% ou bien d'une fixation par le permanganate de potassium (Luft 1956).

—*Contrastants et inclusion*: après la fixation, le matériel lavé est immergé *in toto* et à froid dans un bain d'acétate d'uranium à 1% tamponné à pH 7,2 par le tampon véronal pendant 1 à 2 heures.

L'inclusion est faite dans l'épon; les coupes fines sont contrastées par le citrate de plomb pendant 20 minutes (Reynolds 1963).

Resultats

1° *Taxus baccata*

Au début de décembre, la jeune tétrade de microspores est formée. Les quatre cellules sont disposées dans un même plan et demeurent incluses quelque temps dans l'enveloppe de la cellule mère (Fig. 1). Elles mesurent alors une dizaine de microns de diamètre.

Dans chaque microspore, le feuillet externe de l'enveloppe nucléaire est fréquemment en relation avec des travées du reticulum endoplasmique qui atteignent le plasmalemme (Fig. 3).

C'est au stade de la jeune tétrade de microspores que se forme l'exine (Fig. 1 et Fig. 6).

Ce sont d'abord des structures lamellaires produites au niveau du plasmalemme (Fig. 2) qui s'appliquent les unes sur les autres pour former la nexine alors que simul-

Figs. 1–3. *Taxus baccata*. Double fixation glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium sauf figure 3 (simple fixation OsO₄); contrastants: acétate d'uranium et citrate de plomb. 1, vue d'ensemble de la tétrade. Les quatre noyaux sont visibles dans un cytoplasme contenant des organites peu nombreux. L'exine est déjà représentée par ses deux composantes (sexine et nexine) alors que la paroi spéciale maintient encore les quatre cellules ensemble (flèche). 2, les premiers dépôts du sporoderme sont constitués par les structures lamellaires de la nexine produites au niveau du plasmalemme; en même temps, des sphérules de sporopollénine viennent se fixer sur la nexine. 3, dans la jeune microspore, le feuillet externe de l'enveloppe nucléaire forme des tunnels qui peuvent atteindre le plasmalemme (flèches); les plastes contiennent parfois quelques petits grains d'amidon. Lettres abrégées—A: Amidon, CP₁: Cellule prothallienne 1, CP₂: Cellule prothallienne 2, CR: Cellule reproductrice, CT: Cellule du tube, D: Dictyosome, E: Exine, In: Intine, N: Noyau, N₁: Nexine 1, N₂: Nexine 2, Nu: Nucléole, Pl: Plaste, S: Sexine, V: Vacuole, VG: Vésicule golgienne.

tanément, des sphérules de sporopollénine viennent se déposer sur la couche la plus externe de la nexine (Fig. 3, et Fig. 4). Ces dépôts semblent se faire préférentiellement dans les régions où les strates de la nexine sont les plus serrées. Celles-ci sont enrobées dans un ciment comparable, par sa densité, au contenu des vésicules golgiennes (Fig. 4).

Après la formation de l'exine, la couche interne du sporoderme: l'intine, se dépose entre la nexine et le plasmalemme.

Au cours de la maturation des grains de pollen, l'exine devient plus épaisse; cet accroissement en épaisseur est surtout dû aux dépôts de sphérules de sporopollénine qui recouvrent toute la surface.

En se desséchant, le pollen perd sa forme sphérique; l'exine s'incurve sur une face et demeure bombée sur l'autre. Le grain de pollen fait penser alors à un casque.

2° *Ginkgo biloba*

Les quatre microspores de la tétrade ont une disposition tétraédrique et les sections ne peuvent passer que par le diamètre de trois des quatre noyaux (Fig. 6) Les microspores restent réunies en tétrades pendant très longtemps.

Le noyau occupe un volume important dans chaque cellule; le nucléoplasme présente des régions granulaires et d'autres moins denses aux électrons (Fig. 7).

L'écart entre les feuillettes de la membrane nucléaire est constant; ces derniers s'invaginent fréquemment dans le noyau où ils constituent des tunnels simples ou digités (Fig. 7). Ces structures apparaissent toujours dans les régions non granulaires et de moindre densité du nucléoplasme.

Les premiers dépôts de l'exine apparaissent le long des faces de contact des microspores d'une même tétrade (Fig. 6) par la mise en place des deux strates de la sexine: le tectum et les bacules. Le tectum est déposé en premier lieu contre la paroi spéciale (Fig. 7).

A ce stade, les dictyosomes de la microspore sont constitués par l'empilement de 3 à 4 saccules aplatis qui émettent sur leur marge des vésicules dont le contenu, d'aspect fibrillaire, est très dense aux électrons. On peut suivre leur migration vers le plasmalemme et le déversement de leur contenu dans le périplasma (Fig. 7).

La sexine est doublée intérieurement par la nexine dont les premiers indices de formation apparaissent en même temps que se forment les columelles; celle-ci est formée de deux parties; la *nexine 1* dont la structure est identique à celle de la sexine (Fig. 10) et la *nexine 2* qui conserve un aspect lamellaire. Cette différence persiste jusque dans le grain de pollen (Fig. 10).

La sexine se développe considérablement, son épaisseur atteint 1 micron aux dépens de la région columellaire qui n'est plus représentée que par de larges piliers bordant des tunnels parfois reliés à l'extérieur (Fig. 8 et Fig. 10).

La nexine 2 a une épaisseur finale de 0,15 à 0,2 micron.

Figs. 4-5. *Taxus baccata*. Fixation par le tétr oxyde d'osmium; contrastants: acétate d'uranium et citrate de plomb. 4, détail du cytoplasme périphérique d'une jeune microspore de *Taxus* montrant l'incorporation au périplasma du contenu dense de vésicules produites par un dictyosome très actif (flèche). 5, formation anormale du sporoderme chez *Taxus*: plusieurs strates de la nexine emprisonnent ensemble deux microspores (flèche); les sphérules de sporopollénine n'apparaissent qu'autour de cette enveloppe aberrante.

L'intine, que l'on peut observer dans la microspore âgée entre le plasmalemme et la nexine (Fig. 8), apparaît comme une couche claire de faible épaisseur (0,5 micron).

Le grain de pollen de *Ginkgo* est tétracellulaire lorsqu'il est libéré. L'anthèse est précédée d'une phase de deshydratation qui ne permet plus une fixation correcte du cytoplasme, et le grain de pollen mûr ne peut plus être étudié au niveau des ultrastructures cytoplasmiques.

Le grain de pollen libéré a une forme oblongue, il est creusé d'un sillon longitudinal profond. L'ornementation de l'exine est constituée d'un réseau de crêtes courtes et peu élevées (Fig. 9).

En dépit des mauvaises fixations cytoplasmiques, il est intéressant de faire des coupes à ce stade, car elles permettent d'examiner le sporoderme à l'intérieur du pli longitudinal: tectum et bacules y font défaut, mais les deux couches de la nexine persistent sans montrer de modification dans leur structure (Fig. 10). Nous signalerons toutefois un amincissement de la nexine 1 (Fig. 10).

3° Rupture de l'exine lors de la germination

Dès qu'il est hydraté, le grain de pollen de *Taxus* prend une forme sphérique. L'intine gonfle énormément et provoque l'éclatement de l'exine qui est expulsée. La paroi du tube pollinique est en continuité avec la couche interne de l'intine.

Chez *Ginkgo*, l'hydratation du pollen provoque la rupture de l'exine dans sa partie amincie, du côté de la cellule du tube pollinique. Comme chez *Taxus*, la paroi du tube pollinique et l'intine sont en continuité (Fig. 11).

Discussion

Dans la tétrade, l'enveloppe nucléaire n'a pas le même aspect chez *Taxus* et chez *Ginkgo*.

—chez le premier, elle est en relation directe avec de longues travées du réticulum endoplasmique qui traversent tout le cytoplasme;

—chez le second, on observe de nombreuses invaginations des deux feuillets de l'enveloppe nucléaire à l'intérieur du nucléoplasme.

Ces deux types de modifications sont observées simultanément dans les jeunes microspores de *Podocarpus* (Aldrich and Vasil 1970), à un moment où se déposent les premiers éléments de l'exine et il en est déduit que ces invaginations de la

Figs. 6-8. *Ginkgo biloba*. Double fixation glutaraldéhyde—tétroxyde d'osmium; contrastants: acétate d'uranium et citrate de plomb. 6, les microspores de la tétrade sont axées sur les sommets d'un tétraèdre. Les noyaux sont sphériques et occupent une part importante du volume cytoplasmique. Les premiers dépôts de l'exine n'apparaissent que sur les faces de contact des microspores et en débordent peu. 7, détail d'une jeune microspore montrant les particularités du nucléoplasme et les modalités de la formation du sporoderme: des inclusions nucléoplasmiques périphériques au contenu dense sont formées par l'invagination de la membrane nucléaire. Le nucléoplasme présente des régions de densité variable. Les dictyosomes produisent des vésicules au contenu très dense et qui s'incorpore dans la paroi (flèches). 8, vue d'ensemble de la microspore de *Ginkgo*; observer la discontinuité de la nexine; certains plastes contiennent des quantités d'amidon importantes.

membrane nucléaire associées à ses connexions avec le plasmalemmme par l'intermédiaire du réticulum endoplasmique, peuvent être impliquées dans la synthèse et le transport des précurseurs de l'exine. Ce mécanisme, s'il est concevable chez *Podocarpus*, ne peut fonctionner totalement dans les genres qui nous intéressent puisqu'il y est incomplet.

Ces précurseurs nous paraissent plutôt être produits par les dictyosomes très actifs dans les jeunes microspores de *Taxus* et de *Ginkgo*. En effet, ils secrètent abondamment des vésicules au contenu dense qui s'incorpore au périplasme. La densité du contenu des vésicules est comparable à celle de la primexine qui se dépose à l'extérieur de la cellule (Fig. 4 pour *Taxus* et Fig. 7 pour *Ginkgo*).

Les modalités de l'édification de la sexine sont conformes à celles décrites habituellement.

Les premières couches de la nexine apparaissent chez *Taxus* en même temps que se forme la sexine; chez *Ginkgo*, au contraire, la sexine est édifiée avant que ne se dépose la nexine.

Les éléments lamellaires qui forment la nexine sont fabriqués le long du plasmalemmme. Le plasmalemmme pourrait donc être le site de leur formation, comme le pensent Dickinson et Heslop-Harrison (Dickinson and Heslop-Harrison 1968).

L'origine de la nexine est d'ailleurs confirmée chez *Taxus* où nous avons observé une anomalie dans sa formation: la Fig. 5 de la planche II montre deux microspores emprisonnées, ensemble, par les premiers dépôts de la nexine, les couches internes produites ensuite les enveloppent individuellement. Cette observation ajoutée au fait que les sphérules de sporopollénine ne sont visibles qu'à l'extérieur de la tétrade (ce qui n'est pas le cas normal) (cf. Fig. 1), indique que la nexine est produite par la microspore, tandis que les sphérules de sporopollénine de la sexine sont issues de l'extérieur, probablement du tapis.

L'enveloppe pollinique homogène et inaperturée de *Taxus* diffère de celle de *Ginkgo* qui n'est complète que sur les 3/4 environ de sa surface. En effet, toute la partie dissimulée dans le pli du grain déshydraté est dépourvue de tectum et de bacules, elle joue le rôle de zone germinative (Fig. 11).

La nexine est présente dans cette région (Fig. 10), contrairement à ce que l'on pensait jusqu'alors (Favre-Duchartre 1956, Tulecke 1954).

L'origine de l'hétérogénéité du sporoderme chez le pollen de *Ginkgo* est à rechercher au stade de la tétrade (Fig 6); en effet, les deux premiers dépôts de l'exine (tectum et bacules) ne se font que sur les faces internes des microspores de la tétrade;

Figs. 9–11. *Ginkgo biloba*. 9, le grain de pollen sec a une forme allongée et présente un pli longitudinal profond. L'ornementation de l'exine révélée ici par le microscope électronique à balayage est constituée d'un réseau de crêtes courtes et peu élevées (fixation permanganique 5%); (ombrage: or—palladium). 10, au cours de sa deshydratation, le grain de pollen se creuse d'un profond sillon au niveau duquel l'exine n'est représentée que par la nexine 1 et 2. La sexine recouvre toute la surface extérieure du grain lors de sa dissémination (fixation KMnO_4). 11, vue d'ensemble de la région proximale d'un jeune tube pollinique dont les quatre cellules sont bien visibles: la cellule prothallienne P_1 est dégénérée; par contre, la cellule prothallienne P_2 montre des signes d'activité comparables à ceux que l'on observe dans la cellule reproductrice. Remarquer la rupture de l'exine dans la région amincie provoquée par le développement important de la cellule du tube, et son décollement de l'intine (flèche).

une fois ces deux strates déposées, c'est toute la surface qui s'entoure de la nexine.

La formation du pli au cours de la déshydratation du grain de pollen s'explique donc par un simple phénomène physique lié à la souplesse de l'enveloppe.

Conclusions

En dépit de quelques différences de détail concernant les ultrastructures cellulaires, en particulier celle du noyau, nous constatons que des processus comparables président à la formation du sporoderme, tant chez *Taxus* que chez *Ginkgo*.

Nous avons remarqué l'activité particulière de la membrane nucléaire, du reticulum endoplasmique et surtout des corps de golgi en relation avec l'élaboration de l'exine.

Bien que le sporoderme ne soit pas du même type dans les deux cas, on retrouve les mêmes ultrastructures dans les différentes strates qui le composent.

La rupture de l'exine chez *Taxus* paraît se faire au hasard, sous la pression exercée par l'intine: nous n'avons pas observé de pore ou de zone germinative, tant au microscope électronique à transmission qu'au microscope à balayage. Chez *Ginkgo*, au contraire, la déchirure se fait toujours du côté de la cellule végétative appelée à former le tube pollinique; c'est en effet du côté de la cellule du tube que l'exine est dépourvue de sexine, dans une région repliée à l'intérieur du grain de pollen lors de la dissémination.

Cette zone germinative, d'un intérêt capital pour le bon développement d'un gamétophyte mâle produit par un grain de pollen tétracellulaire, serait d'ailleurs parfaitement inutile chez *Taxus* où le pollen est libéré à l'état de microspores unicellulaires.

Le sporoderme est donc constitué d'une série d'enveloppes hautement spécialisées: l'exine, très résistante, assure la protection du grain de pollen durant la période plus ou moins longue qui sépare l'anthèse de la pollinisation; dès que la germination est amorcée, c'est à l'intine de jouer son rôle en participant à l'édification de la paroi du tube pollinique.

Résumé

Dans les deux genres étudiés, il est remarqué une activité particulière de l'enveloppe nucléaire et des corps de golgi, en relation probable avec l'édification de l'exine dans la jeune tétrade.

Chez *Taxus*, la sexine et la nexine se déposent en même temps. La nexine, constituée de strates de structure lamellaire, est produite au niveau du plasmalemme par la microspore alors que la sexine, composée uniquement de sphérules de sporopollénine, est formée hors de la microspore.

Chez *Ginkgo*, la sexine (tecum et bacules) se dépose en premier lieu. La nexine 1, de structure analogue, est formée ensuite; c'est en dernier lieu que s'édifie la nexine 2, comparable par sa structure, à la nexine de *Taxus*.

La sexine est absente dans le pli longitudinal du grain de pollen deshydraté de *Ginkgo*; c'est par cette région amincie où l'exine n'est plus représentée que par les

deux couches de la nexine, que se fera l'émergence pollinique.

Key words: Microspore, exine, *Taxus*, *Ginkgo*.

Summary.

In both genus, the nuclear envelope and the golgi bodies show a particular activity which is probably related to the exine depositing. This phenomenon occurs in the early tetrad stage.

Sexine and nexine are simultaneously elaborated in *Taxus*. The nexine, which is constituted by strata with lamellar structure is produced by the microspore. The sexine which is only composed of sporopollenin bodies is formed outside the microspore.

The exine layers of *Ginkgo* microspore are successively deposited: — firstly the sexine (tectum and bacula) — secondly the nexine 1—finally the nexine 2 the structure of which is similar to the *Taxus* nexine.

Inside the longitudinal slit of the dehydrated pollen grain of *Ginkgo* the sexine is lacking, the only components of the sporoderm are the two nexine layers. During the germinating process the pollen tube bursts out of this thinned area of the male gametophyte.

References

- Aldrich, H. C. and Vasil, I. K. 1970. Ultrastructure of the postmeiotic nuclear envelope in microspores of *Podocarpus macrophyllus*. J. Ultrastructure Research **32**: 307–315.
- Brooks, J. and Shaw, G. 1971. Recent developments in the chemistry, biochemistry, geochemistry and post-tetrad ontogeny of sporopollenins derived from pollen and spore exine. In: J. Heslop-Harrison (editor): Pollen development and physiology. p. 99–114. Butterworths, London.
- Dickinson, H. G. 1970. Ultrastructural aspects of primexine formation in the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*. Cytobiol. **1**: 437–449.
- and Heslop-Harrison, J. 1968. Common mode of deposition for the sporopollenin of the sexine and the nexine. Nature **220**: 926–927.
- Echlin, P. and Godwin, H. 1968. The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* II. Pollen grain development through the callose special wall stage. J. Cell. Sc. **3**: 175–186.
- Erdtman, G. 1966. Sporoderm morphology and morphogenesis. A collocation of data and supposition. Grana Palynol. **16**: 318–323.
- Favre-Duchartre, M. 1956. Contribution à l'étude de la reproduction chez le *Ginkgo biloba*. Rev. Cytol. et Biol. vég. XVII **1–2**: 214 p.
- Heslop-Harrison, J. 1968. Pollen wall development. Science **161**: 230–237.
- Lepouse, J. 1970. Etude des premiers stades de la formation des envelopes des grains de pollen de sapin. C. R. Acad. Sci. **270**: 2929–2931.
- Luft, J. H. 1956. Permanganate, a new fixative for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol. **2**: 799.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as one electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. **17**: 208–212.
- Sitte, P. 1953. Untersuchungen zur submikroskopischen Morphologie der Pollen- und Sporenmembranen. Mikroskopie **8**: 290–299.
- Tulecke, W. 1954. Preservation and germination of the pollen of *Ginkgo biloba* under sterile conditions. Bull. Torrey Bot. (Club) **81**: (6): 509–512.
- Willemse, M. Th. M. 1971. Morphological and quantitative changes in the population of cell organelles during microsporogenesis of *Pinus sylvestris* L. III. Changes during the tetrad stage and in the young microspore. Acta Bot. Neerl. **20**: 498–523.