Evolution Ultrastructurale des Cellules à Réserves du Mégagamétophyte de *Cycas* en Culture *in vitro*

René Rohr

Laboratoire de Botanique II, Université de Nancy I, c.o. 140 F. 54037
Nancy Cedex France

Reçu le 11, September, 1979

La culture des mégagamétophytes des Préspermaphytes a été réalisée avec succès dans plusieurs genres: ainsi, en cultivant le prothalle femelle de *Ginkgo*, il a été possible d'isoler un tissu haploïde (Tulecke 1964, Rohr 1978,); chez les Cycadales, la culture des mégagamétophytes a même permis d'observer des cas d'apogamie chez *Zamia* (Larue 1948, Norstog 1965) et *Cycas* (Duchartre 1888, Larue 1954).

Il est remarquable que les tissus de ces gamétophytes dont la fonction essentielle est d'apporter à l'embryon puis au jeune sporophyte les éléments nutritifs nécessaires à leur développement, puissent proliférer et même montrer une organogénèse dans des conditions de culture appropriées.

Nous avons montré précédemment chez *Ginkgo* (Rohr 1977, Rohr 1980) que les divers types cellulaires du mégagamétophyte qui sont pourtant dans des états de différenciation très variés, sont tous susceptibles de révéler en culture des potentialités dissimulées dans les conditions naturelles, comme leur verdissement et leur prolifération.

Dans le mégagamétophyte de *Cycas revoluta*, les tissus de l'endosperme qui paraissent moins diversifiés que ceux de *Ginkgo*, emmagasinent néanmoins les mêmes types de réserves. Pour essayer de comprendre son évolution en culture, nous avons tenté d'identifier chez *Cycas* les tissus capables de proliférer sur milieu artificiel et le but du présent travail est de décrire les modifications ultrastructurales qui se manifestent au cours des premiers stades de leur évolution.

Matériel et méthodes

Les ovules de *Cycas revoluta* ont été récoltés à Cannes au début du mois de janvier; dans le cône femelle que nous avons prélevé, la grande majorité des ovules avait cessé de se développer à un stade juvénile. L'absence de pollinisation et les conditions climatiques pourraient être les causes de l'avortement de la plupart des gamétophytes femelles. Seuls ceux issus d'ovules ayant atteint leur taille définitive (3, 5 × 4 cm) ont été utilisés pour l'étude ultrastructurale et la mise en culture.

Conditions de culture: les ovules débarrassés de leur sarcotesta orange sont lavés à l'eau distillée et rincés à l'alcool éthylique à 80°. Les manipulations suivantes sont réalisées en conditions aseptiques: les mégagamétophytes mis à nu sont sectionnés transversalement en quatre parties d'égale épaisseur. Les tranches

de prothalles sont mises en culture dans des fioles coniques de 250 ml contenant 100 ml de milieu gélosé.

La composition du milieu de culture est la suivante (en mg/l) K NO₃: 950; NH₄NO₃: 720; Mg SO₄, 7H₂O: 185; Ca Cl₂: 166; KH₂PO₄: 68; K I: 0, 5; H₃BO₃: 0, 2; Mn SO₄, H₂O: 0, 8; Zn SO₄, 7H₂O: 0, 5; Cu SO₄, H₂O: 0, 02; Mo O₃: 0, 01; Co Cl₂, 6H₂O: 0, 01; pantothénate de calcium: 1; chlorhydrates de pyridoxine: 0, 5 et de thiamine: 0, 5; acide nicotinique: 5; mésoinositol: 100; glyocolle: 2; biotine: 0, 5; adénine: 5; acide folique: 0, 5; hydrolysate de caséine: 500; saccharose: 20000; agar agar: 8000.

Le pH est ajusté à 6 avec de la soude: après 20 mn de stérilisation à 120°C à l'autoclave, le milieu refroidi est additionné avant solidification de 5 mg d'acide 2-4 dichlorophénoxyacétique en solution aqueuse filtrée sur membrane (0.45 µm).

Les échantillons sont enfoncés de 5 mm environ dans le milieu solidifié soit à plat, soit sur la tranche et cultivés à une température voisine de 20°C sous un éclaircissement de 4000 lux 16 h/j.

Microscopie électronique: les échantillons des divers tissus gamétophytiques prélevés avant la mise en culture et après deux mois de culture sont d'abord fixés pendant 1 h 30 mn par une solution à 2, 5 % de glutaraldéhyde dans le tampon phosphate à pH 7, 2 à la température de 0°C; ils sont ensuite lavés dans le tampon phosphate puis le tampon véronal à pH 7, 2 et post-fixés dans une solution à 2 % de tétroxyde d'osmium dans le dernier tampon pendant 1 h à la même température.

Après la fixation osmique, le matériel lavé est contrasté pendant une nuit à 0°C par une solution à 1 % d'acétate d'uranium tamponnée à pH 7, 2 par le tampon véronal.

Les coupes ultrafines réalisées au couteau de diamant sont contrastées enfin par le citrate de plomb pendant 20 mn (Reynolds 1963).

Résultats

Après deux mois, les différentes parties des prothalles femelles de *Cycas* mis en culture présentent des modifications remarquables, qui peuvent être observées sur tous les échantillons:

—la surface du gamétophyte, qui était initialement de couleur ivoire, montre un léger verdissement;

—le volume des morceaux de prothalle augmente de façon importante, au point qu'il devient nécessaire de les fragmenter pour parvenir à les extraire des fioles de culture; il apparaît en plusieurs points de la surface du prothalle des excroissances denses et blanchâtres dont la taille est comprise entre 2 et 5 mm (Figs. 1, 4, flèches). Dans quelques cas, la dépression micropylaire se trouve partiellement comblée par ce même type de formations tissulaires (Fig. 1, flèche courte).

—l'évolution des tissus internes est plus spectaculaire encore puisqu'elle se généralise à tout le plan des sections mises au contact de l'air (Fig. 2); la surface de coupe qui était au départ lisse et blanche apparaît maintenant boursoufflée et hyaline (Figs. 2, 3). Les parties des sections enfoncées dans le milieu gélosé ne sont le siège d'aucun développement apparent.

Nous étudierons successivement l'ultrastructure avant la mise en culture, des cellules marginales du prothalle et des cellules des tissus internes, puis celle des diverses excroissances tissulaires néoformées.

Les cellules de l'assise externe du prothalle sont isodiamétriques (15 à 20 μm) et limitées entre elles par des parois épaisses (1, 2 μm); leur paroi externe est con-

Liste des abréviations. A: amidon; C1: cellule de l'assise externe; C2: cellule de la 2^e assise cellulaire; D: dictyosome; EM: excroissance marginale; GL: globule lipidique; M: mitochondrie; N: noyau; P: paroi; Pl: plaste; RE: réticulum endoplasmique; TI: tissu interne; V: vacuole.

Figs. 1 à 4: Prothalle de *Cycas* après deux mois de culture. 1, parties micropylaire (à gauche) et hilaire (à droite) du prothalle. La surface de la partie micropylaire montre de nombreuses excroissances tissulaires blanchâtres (flèches épaisses); la dépression micropylaire est elle-même comblée par une importante masse tissulaire néoformée (Flèche courte). Le même type d'excroissances apparaît également sur la surface de la partie inférieure du prothalle (flèche fine) $\times 2$. 2, développement du tissu interne sur une tranche de prothalle; le tissu à réserves amylacées est devenu hyalin. $\times 2$. 3, le développement des tissus marginaux forme sur le bord de la section un bourrelet continu (flèches). Remarquer l'abondance du développement des tissus internes. $\times 10$. 4, détail d'une excroissance marginale; on note à sa surface des régions sombres (flèche) formées de cellules nécrosées et d'autres hyalines constituées de cellules actives. $\times 20$.

stituée de deux couches d'épaisseur et de densité différentes: une couche interne comparable aux autres parois par sa largeur et sa transparence et une couche externe épaisse de 0.5 μm , plus dense aux électrons, doublée extérieurement d'une très fine membrane prothallienne (Fig. 5, pointes de flèches).

Figs. 5-7. 5, cellules de l'assise externe du prothalle avant la mise en culture: la paroi marginale, constituée de deux couches de densité différente, est recouverte par une fine pellicule (pointe de flèche). Remarquer l'abondance des réserves lipidiques. 6, détail d'une cellule marginale: les plastes sont des amyloplastes qui contiennent peu d'amidon; les mitochondries sont globuleuses avec des crêtes denses aux électrons. 7, cellule de la 2^e assise (C2) bordée par deux cellules de l'assise externe. Les réserves lipidiques ont presque totalement disparu; les vacuoles contiennent des inclusions de densité moyenne peu condensées; les amyloplastes renferment plusieurs gros grains d'amidon.

Le cytoplasme de ces cellules renferme d'importantes réserves lipidiques contenues dans des gouttelettes dont le diamètre, très variable, peut atteindre près de $3\ \mu\text{m}$; l'appareil vacuolaire est assez bien représenté; il est constitué de vacuoles de taille et de densité inégales: les plus grandes sont transparentes, les plus petites renferment une substance d'aspect granulaire (Fig. 5, flèche).

Dans les espaces libres du cytoplasme, on rencontre les autres organites cellulaires:—quelques dictyosomes qui sécrètent des vésicules claires de grande taille (Fig. 5); — les plastes ont un stroma peu dense aux électrons. Il est traversé par de rares membranes et contient quelques grains d'amidon de petite taille (Figs. 5, 6); — les mitochondries, plus nombreuses, ont des profils circulaires; dans le stroma de densité hétérogène, les crêtes ont des lumières denses (Fig. 6); — le réticulum endoplasmique, de type lisse, est formé de travées courtes; — le noyau de ces cellules occupe une position centrale; il montre une chromatine peu condensée (Fig. 6).

L'ultrastructure des assises cellulaires marginales plus internes est nettement différente: dès la deuxième assise cellulaire, il n'y a plus de réserves lipidiques puisque celles-ci ne sont plus représentées que par quelques globules appliqués contre le plasmalemma ou dispersés dans le cytoplasme (Fig. 7). Par contre, d'autres types de réserves prennent une part plus importante dans ces cellules: c'est le cas de l'amidon, contenu dans de gros amyloplastés et dont les grains dépassent $4\ \mu\text{m}$; les vacuoles se chargent également d'un contenu peu dense aux électrons, qui se condense en amas intravacuolaires de taille variée (Fig. 7).

Dans ces assises sous-jacentes, les attitudes fonctionnelles des autres organites cellulaires (mitochondries, dictyosomes, réticulum endoplasmique) ne présentent pas de différences significatives avec celles des organites des cellules les plus externes.

Les cellules des tissus internes constituent la plus grande partie de l'endosperme dans le mégagamétophyte de *Cycas*; ce sont des cellules de grande taille très spécialisées.

Elles sont remplies de réserves amylacées contenues dans de gros amyloplastés (Fig. 9). Dans ces cellules, le cytoplasme très vacuolisé renferme peu d'organites: — les mitochondries globuleuses ne diffèrent pas sensiblement de celles des tissus marginaux; — on note aussi dans ces cellules la présence de quelques globules lipidiques (fig. 8); — les vacuoles renferment des substances de densité variable mais peu abondantes; — le hyaloplasme a un aspect granulaire, il contient très peu de ribosomes (Figs. 8, 9); — les parois cellulaires sont percées de nombreux plasmodemes de formes complexes (Figs. 8, 9).

Après deux mois de culture, toute la surface du prothalle verdit. C'est un proremaniement de l'ultrastructure plastidiale qui en est à l'origine: dans les cellules de l'assise externe (Fig. 11) et dans les quelques assises sous-jacentes (Fig. 12), les plastes montrent des modifications importantes. Ils retrouvent des formes plus régulières et une taille plus modeste; l'amidon a complètement disparu de la plupart d'entre eux. Le stroma devenu plus dense aux électrons a une structure granulaire. Il contient désormais de nombreux plastoglobules osmiophiles et des thylacoïdes organisés en système granaire (Fig. 11). La plupart des plastes sont devenus des chloroplastes avec un appareil granaire bien développé, même dans les cellules qui ne se trouvent pas directement en surface (Fig. 12).

Figs. 8-10. 8-9, cellules du tissu interne du prothalle avant la mise en culture. Dans le hyaloplasme, il n'y a pratiquement pas de ribosomes, les organites cytoplasmiques sont rares. L'essentiel des réserves est constitué par d'énormes grains d'amidon contenus dans des amyloplastés démesurés; on note encore la présence de quelques globules lipidiques (Fig. 8). Les parois sont traversées par endroits par de nombreux plasmodésmes de formes complexes (Fig. 9). 10, partie d'une cellule produite par le tissu interne après deux mois de culture. Les organites cellulaires (dictyosomes, mitochondries, réticulum endoplasmique) sont mieux représentés; les plastides contiennent des grains d'amidon de petite taille; le stroma plastidial contient des canalicules clairs.

Figs. 11–13. Evolution des plastes après deux mois de culture, dans l'assise externe (Fig. 11) et dans les tissus marginaux sous-jacents (Fig. 12). Dans les deux cas, le stroma s'enrichit de plastoglobules et de thylacoïdes dont l'empilement conduit à la formation de grana (Fig. 12). 13, cellule d'une excroissance marginale dense âgée de deux mois. Les réserves lipidiques ont totalement disparu; le réticulum endoplasmique, parfois bordé de quelques ribosomes, montre un développement important; les dictyosomes sont nettement polarisés et sécrètent abondamment; dans les plastes, le stroma granuleux renferme des canalicules clairs et de nombreux grains d'amidon de taille inégale.

Figs. 14–16. Evolution des tissus à réserves amylacées en culture. Le cytoplasme s'enrichit d'un nombre considérable de ribosomes qui sont le plus souvent associés en polyribosomes et fixés sur les membranes du réticulum endoplasmique (Fig. 14). Les plastes sont encore des amyloplastes mais l'amidon y est souvent moins abondant (Fig. 15); certains en sont même totalement dépourvus (Fig. 16). Les dictyosomes sont rudimentaires mais sécrètent abondamment. Remarquer deux organites à contenu granulaire, entourés par une simple membrane (Figs. 15 et 16, pointe de flèches).

Simultanément les parois de toutes ces cellules s'épaississent fortement (Fig. 11).

Les excroissances tissulaires produites en plusieurs points de la surface du mégagamétophyte sont formées de cellules à contours irréguliers.

— leur noyau sphérique occupe encore une position centrale; sa chromatine forme un réseau lâche d'amas granulaires peu condensés (Fig. 13). On y rencontre jusqu'à trois nucléoles sur une même section.

— le réticulum endoplasmique est toujours de type lisse, il est toutefois mieux représenté dans ces cellules que dans celles qui leur ont donné naissance puisqu'il est formé de travées allongées dont certaines se disposent parallèlement à la membrane nucléaire et d'autres autour des plastes (Fig. 13).

— les dictyosomes nettement polarisés sont constitués par l'empilement de 4 à 6 saccules aplatis et sécrètent abondamment de petites vésicules dont le contenu est parfaitement transparent aux électrons.

— les plastes sont des amyloplastes qui contiennent jusqu'à une dizaine de grains d'amidon; la taille des plus gros d'entre eux est de l'ordre de $2\ \mu\text{m}$. Dans le stroma plastidial dense, on observe un réseau de canalicules élargis dont le contenu est transparent.

— les mitochondries ont des formes variées; dans leur stroma riche en fibrilles, les crêtes sont nombreuses (Fig. 13).

Des modifications plus nombreuses et plus spectaculaires que dans les tissus marginaux affectent les cellules des tissus internes à réserves amylacées au cours des deux premiers mois de culture:

— le phénomène le plus marquant est l'apparition dans le hyaloplasme de ribosomes extrêmement nombreux (Figs. 10 et 14, 15, 16). Très souvent, ils sont associés en polyribosomes (Fig. 10, 14) et fixés sur les membranes du réticulum endoplasmique (Figs. 14, 15).

— bien que l'on trouve encore quelquefois des amyloplastes importants contenant de gros grains d'amidon (Fig. 16), on observe la plupart du temps une régression des réserves amylacées. Les grains d'amidon sont souvent plus petits (Fig. 10) et moins nombreux (Fig. 15); certains plastes deviennent même des leucoplastes (Fig. 16). Le stroma plastidial, devenu plus dense, contient des canalicules clairs (Fig. 10).

— les dictyosomes ont une structure simple et sécrètent de nombreuses vésicules (Figs. 10 et 16: flèches).

— les mitochondries ont un aspect différent de celui rencontré jusqu'ici: dans le stroma granulaire et dense, les crêtes encore nombreuses sont élargies et transparentes.

— le noyau a les mêmes caractères ultrastructuraux que dans les cellules des excroissances marginales.

— enfin, le cytoplasme renferme aussi des organites de petite taille ($0,5\ \mu\text{m}$) limités par une simple membrane et renfermant une substance granuleuse (Figs. 15 et 16, points de flèches). Par leur aspect, ils ressemblent à des lysosomes, mais en l'absence de test cytochimique, nous n'avons pu déterminer leur nature précise.

Discussion et conclusion

Certaines des modifications que nous avons signalées chez *Ginkgo biloba* dans les premiers mois de culture du gamétophyte (Rohr 1977) s'observent également, avec des degrés divers chez *Cycas revoluta* après la même durée: c'est ainsi que dans les deux cas le volume du prothalle augmente par suite de l'accroissement de la taille de ses cellules et sa surface verdit. Les proliférations denses et blanches qui se développent sur la surface du prothalle de *Cycas* par suite de la multiplication des cellules de certains tissus marginaux, sont comparables à celles que nous avons rencontrées chez *Ginkgo*, au verdissement près (Rohr 1977).

Toutefois, l'évolution des tissus internes de l'endosperme de *Cycas* ne concerne pas comme c'est le cas chez *Ginkgo* une mince bande de tissus située à la surface du milieu de culture, mais elle s'étend à toute la surface de la section mise à l'air, même lorsque celle-ci est orientée du côté opposé au milieu. Le développement de ces tissus à réserves amylacées s'obtient donc dans des conditions culturelles moins strictes que pour *Ginkgo*.

L'étude ultrastructurale de l'endosperme de *Cycas* a permis d'y reconnaître plusieurs types cellulaires qui montrent de grandes analogies avec les divers tissus à réserves du prothalle femelle de *Ginkgo* (Favre-Duchartre 1956, Dexheimer 1973).

Les tissus à réserves lipidiques constituent chez *Cycas* une très fine pellicule autour du prothalle puisque l'essentiel de ces réserves se localise dans l'assise cellulaire la plus externe; dans les assises marginales sous-jacentes où l'on rencontre encore quelques globules lipidiques, les réserves amylacées se font plus abondantes et les vacuoles renferment des inclusions plus ou moins condensées qui rappellent par leur aspect ultrastructural les réserves protéolipidiques des cellules de la zone à protéolipides du mégagamétophyte de *Ginkgo*. Enfin, on trouve dans les deux cas une importante masse d'amidon emmagasinée dans les tissus profonds du prothalle.

Ces différents tissus du prothalle femelle de *Cycas* se distinguent essentiellement les uns des autres par la nature des réserves qu'ils stockent; nous avons remarqué une analogie dans les attitudes fonctionnelles de la plupart des organites cellulaires dans ces divers tissus. Ils présentent sensiblement le même état de spécialisation et cela pourrait expliquer que l'on puisse obtenir en culture leur différenciation dans des conditions semblables.

Toutefois, ces tissus n'ont pas en culture un comportement identique en tous points puisqu'après deux mois de culture, on observe des différences ultrastructurales plus marquées entre les deux types de proliférations cellulaires issues de ces tissus, du moins pour certains organites. Le tissu résultant de la multiplication des cellules internes du prothalle montre des signes d'une activité plus intense que celui produit par les tissus marginaux. On remarque en particulier une très grande activité ribosomale en liaison avec le réticulum endoplasmique, indiquant une phase de synthèses importante; de même, les mitochondries paraissent être plus actives dans ce tissu produit par les cellules à amidon du centre du prothalle.

Ainsi, cette étude montre pour la première fois au niveau ultrastructural un type d'évolution originale du mégagamétophyte de *Cycas* cultivé *in vitro* sur un milieu artificiel chimiquement défini. Les tissus spécialisés dans l'accumulation

des réserves, qu'elles soient lipidiques, amylacées ou autres, peuvent se différencier en culture dans des conditions appropriées.

Comme cela a été montré ailleurs (Rohr1 1980), la différenciation cellulaire dans ces tissus se traduit dans tous les cas par une diminution importante des réserves accumulées; lorsqu'il s'agit de réserves lipidiques, elles peuvent même disparaître en totalité. On observe parallèlement une reprise de l'activité des principaux organites cellulaires: le noyau activé contient de nombreux nucléoles, les ribosomes se multiplient, les mitochondries et les dictyosomes sont plus actifs tandis que les plastides se différencient en leucoplastes dans les tissus internes et édifient un appareil photosynthétique dans les tissus plus périphériques.

Résumé

L'endosperme de *Cycas revoluta* sectionné en plusieurs parties a été cultivé *in vitro* sur un milieu synthétique solidifié. Après deux mois de culture seulement, une évolution remarquable des divers tissus gamétophytiques a pu être mise en évidence. Les tissus marginaux produisent des excroissances denses blanchâtres et les tissus internes du prothalle prolifèrent lorsqu'ils sont mis à l'air.

Les différents tissus du mégagamétophyte sont étudiés au niveau ultrastructural: l'assise cellulaire externe se distingue des autres par une accumulation considérable de réserves lipidiques; dans les tissus sous-jacents, les réserves lipidiques décroissent et font place à des réserves amylacées dans les plastides et à des réserves intravacuolaires rappelant des réserves protéolipidiques. Enfin, le tissu interne ne contient pratiquement que de l'amidon en très grande quantité.

Cette étude montre en outre, que dans des conditions de culture *in vitro* appropriées, tous ces tissus spécialisés dans le stockage des réserves peuvent pourtant se différencier. Dans tous les cas, cette évolution s'accompagne de la disparition partielle ou totale des réserves dans les cellules et d'une activation de la plupart des organites cellulaires.

Summary

Ultrastructural evolution of storage cells of the *Cycas* megagametophyte cultured *in vitro*

Fragments of *Cycas revoluta* endosperm have been cultured *in vitro* on synthetic agar medium. After two months the different gametophytic tissues exhibited a notable development: the marginal tissues of the gametophyte produced globular white outgrowths whereas the internal tissues proliferated when in contact with the air.

The ultrastructural changes of these different tissues was studied; the outer cellular layer showed a conspicuous accumulation of lipids which decreased in the underlying tissues; the internal tissues contained high amounts of starch.

The cells of these highly specialized tissues are able to dedifferentiate when cultured *in vitro* under appropriate conditions. In the course of this original evolu-

tion partial or complete disappearance of reserves and activation of most of cell organelles can be observed.

Bibliographie

- Dexheimer, J. 1973. Etude ultrastructurale du gamétophyte femelle de *Ginkgo biloba* L. Les cellules à réserves. *Caryologia suppl.* **25**: 85–96.
- Duchartre, P. 1888. Notes sur l'enracinement de l'albumen d'un *Cycas*. *Bull. Soc. bot. Fr.* **35**: 243–251.
- Favre-Duchartre, M. 1956. Contribution à l'étude de la reproduction chez le *Ginkgo biloba*. *Rev. Cytol. et Biol. vég.* **17** (1–2): 214 p.
- Larue, C. D. 1948. Regeneration in the gametophyte of *Zamia floridana*. *Bull. Torrey Bot. Club* **75**: 597–603.
- 1954. Studies on growth and regeneration in gametophytes and sporophytes of gymnosperms. *Brookhaven Symp. Biol.* **6**: 187–208.
- Norstog, K. 1965. Induction of apogamy in megagametophytes of *Zamia integrifolia*. *Amer. J. Bot.* **52**(10): 993–999.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**: 208–212.
- Rohr, R. 1977. Evolution en culture *in vitro* des prothalles femelles âgés chez le *Ginkgo biloba* L. *Z. Pflanzenphysiol.* **85**: 61–69.
- 1978. Ultrastructure du tissu haploïde de *Ginkgo biloba* L. *Z. Pflanzenphysiol.* **87**: 365–378.
- 1980. Dédifférenciation en culture *in vitro* des cellules à réserves dans l'endosperme de *Ginkgo biloba*. *Z. Pflanzenphysiol.* **96**: 423–434.
- Tulecke, W. 1964. A haploid tissue from the female gametophyte of *Ginkgo biloba* L. *Nature* **203**: 94–95.
-