

LA COLORATION VITALE AVEC LE MÉTHYLEN BLEU CHEZ
Verbascum phlomoides et *Convolvulus arvensis*

Acad. EMIL POP et DORINA CACHIȚĂ-COSMA

Les auteurs ont étudiés par la coloration vitale avec le méthylene bleu les formations dénommées „chlorogonoplastes“ par I. Politis et ont prouvé que ces formations ne sont pas des plastes mais des corpuscules vacuolaires, résultés d'habitude, en des maintes types de jus cellulaire par la réaction d'un colorant vital basique avec les substances diffusées en préalable dans le jus cellulaire. À la fois ils demandent qui-l faut radier le terme „chlorogonoplastes“ de la terminologie cytologique.

Le cytologue I. POLITIS (Athènes) s'est occupé, dans des nombreux ouvrages, avec des différents corpuscules intracellulaires, en les dénommant, généralement, des „plates“ (tanino —, chlorogonomelano —, verbascinoplastes, selon la nature de la substance produite par chacun). Parmi eux il fait particulièrement attention aux corpuscules dont il compte comme responsables pour la production et l'accumulation d'acide chlorogénique et lesquels il baptise, en 1948, comme *chlorogonoplastes* (5), puis vulgarisé par KÜSTER sous la variante, de *chlorogenoplastes* (10).

I. POLITIS mit en évidence la présence des „chlorogonoplastes“ chez différentes espèces de *Solanaceae* (5), *Compositae* (6), *Scrophulariaceae* et *Convolvulaceae* (7). Il en est à souligner le détail que I. POLITIS mit en évidence les corpuscules en discussion, par le traitement des tissus avec du bleu de méthylene en des solutions diluées, qui sont laissées en action pendant 20—24 heures, sans contrôler, dans cet interval, les aspects intermédiaires, qui pourraient paraître sous l'action continue du réactif.

Les corpuscules obtenus ont une forme sphérique et ils s'envisagent soit comme des sphères relatives grandes, plus ou moins solitaires dans-

une cellule, soit comme des agrégats en forme de grappe, composés par des sphères plus petites. Parfois, les grandes sphères ont des excroissances arrondies, plus petites, et à côté des grappes, on peut observer des corpuscules indépendants. Ces aspects sont considérés par I. POLITIS comme des phénomènes d'autoreproduction par bourgeonnement. Les formations donnent la réaction positive de l'acide chlorogénique.

Dans le contexte des ouvrages cités, il en résulte que d'après l'opinion de l'auteur, ces formations existent dans la cellule, le réactif ayant seulement le rôle d'y mettre en évidence leur présence. En ajoutant aussi leur faculté d'autoreproduction, l'auteur les considère des plastides, en les dénommant „chlorogonoplastes“.

Il en est quand-même significative l'observation faite par POLITIS chez *Verbascum phlomoides* et *Ipomoea batatas*, où il y a lieu une coalescence tardive des „chlorogonoplastes“, qui donnent naissance à une „grande vacuole avec un contenu de l'acide chlorogénique“ (7). Observons qu'un tel phénomène est en contradiction avec la notion de plastide.

Déjà en 1951 un d'entre nous a confirmé l'analogie parmi les „chloroplastes“ de Politis et les corpuscules qui se forment dans la cellule par suite de la coloration vitale, par la réaction entre le colorant et quelques substances dispersées diffusément dans le jus cellulaire; les corpuscules ne peuvent pas avoir la qualité de plastides (8). Il s'est montré ainsi le soupçon que les chlorogonoplastes et même d'autres „plastides“ obtenues avec la même méthode, par Politis, ne sont d'autre chose que des corpuscules vacuolaires, résultats par suite de la coloration vitale avec des différents colorants basiques.

Mais, pour établir la vérité dans cette problême, avec nos collaborateurs, nous avons mené une enquête sur quelques testes végétales utilisées aussi par Politis.

Dans le présent ouvrage nous nous bornerons aux observations faites sur l'épiderme supérieure et inférieure des pétales de *Verbascum phlomoides* et sur celles des feuilles de *Convolvulus arvensis*, dans le mois d'octobre 1965, donc au fin de la période de végétation des ces plantes.

La méthode du travail. La coloration du tissu végétal s'est faite avec des solutions aqueuses de métylen bleu, en des dilutions de 1/10.000 et 1/100.000, ayant maintenu constantes les valeurs du pH, à l'aide d'un système tampon, en conformité avec les recommandations de S. STRUGGER (11). On a embrassé entièrement le registre des pH alcalins, en partant du point neutre, parce-que, comme l'on sait d'après la littérature spéciale (3), le métylen bleu vient s'accumuler dans les vacuoles des cellules végétales plus intensif quand le milieu extérieur est basique. L'accumulation a été poursuivie plusieurs fois, à des intervalles de temps de : 1, 2, 6, 12, 24 et 48 heures depuis le commencement de la coloration.

Les résultats et leur discussion.

Dans tous les cas, aussi chez *Verbascum phlomoides* comme chez *Convolvulus arvensis*, la coloration des cellules a commencé par l'accumulation diffuse du colorant dans les vacuoles. Notamment chez le *Ver-*

bascum phlomoides, où les vacuoles épidermales des pétales sont chargées avec des pigments de la groupe des flavones, la coloration est rapidement visible par le changement de la couleur des vacuoles, du jaune très pale, en des nuances vertes fortes — vertes bleuâtres.

Déjà dans la première heure de la coloration, chez les deux testes et presque chez toutes les valeurs du pH étudiées, dans les vacuoles on se remarque l'apparition de quelques corpuscules ponctiformes pris dans une vive agitation brownienne. En fonction de la concentration du colorant, de même comme du pH de la solution, les corpuscules s'augmentent après, et donnent naissance à des corpuscules ayant les formes typiques connues dans les expériences de la coloration vitale avec des colorants basiques : des sphères indépendantes ou des agglomérations en grappe, qui sont dénommées dans la littérature, staphyloïdes (8), „dendrites“ (1) ou cristales. Il faut donc constater catégoriquement la qualité de „plastés“ des quelques formations vacuolaires expérimentalement obtenues par la réaction d'un colorant vital et les substances qui sont dispersées dans le jus cellulaire. La „préexistence“ des corpuscules est donc irréaliste.

Par suite, on s'aperçoit que la formation des petits corpuscules n'a pas lieu comme conséquence d'une réaction de coloration spécifique du méthylene bleu avec l'acide chlorogénique. M. KEUL et G. LAZĂR (4) dans la même enquête, ont obtenu des corpuscules sphériques chez les cellules épidermales de *Verbascum ovalifolium* et pas seulement avec le méthylene bleu, mais aussi avec le rouge neutre et la rhodamine B.

Une des nos expériences, *in vitro*, nous amène à supposer que du moins dans le cas des pétales de *Verbascum*, une partie des substances du jus cellulaire, qui soit responsable de la genèse des corpuscules, sont les flavones. Nous avons fait des extraits alcooliques de flavones chez les pétales de *Verbascum phlomoides*, puis la substance obtenue après l'évaporation d'alcool nous l'avons dissoute dans l'eau. Cette solution traitée avec du méthylene bleu, a amené à la formation des corpuscules sphériques, microscopiques, analogues en grandes lignes avec ceux obtenus *in vivo*.

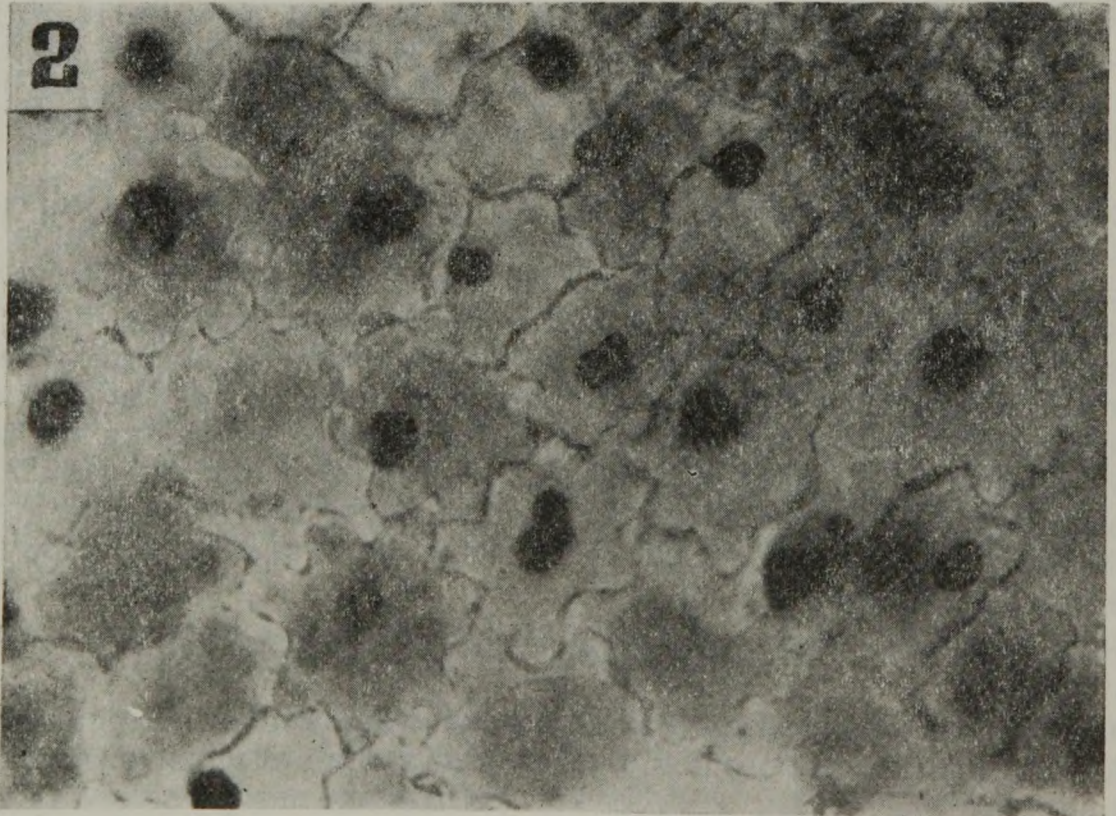
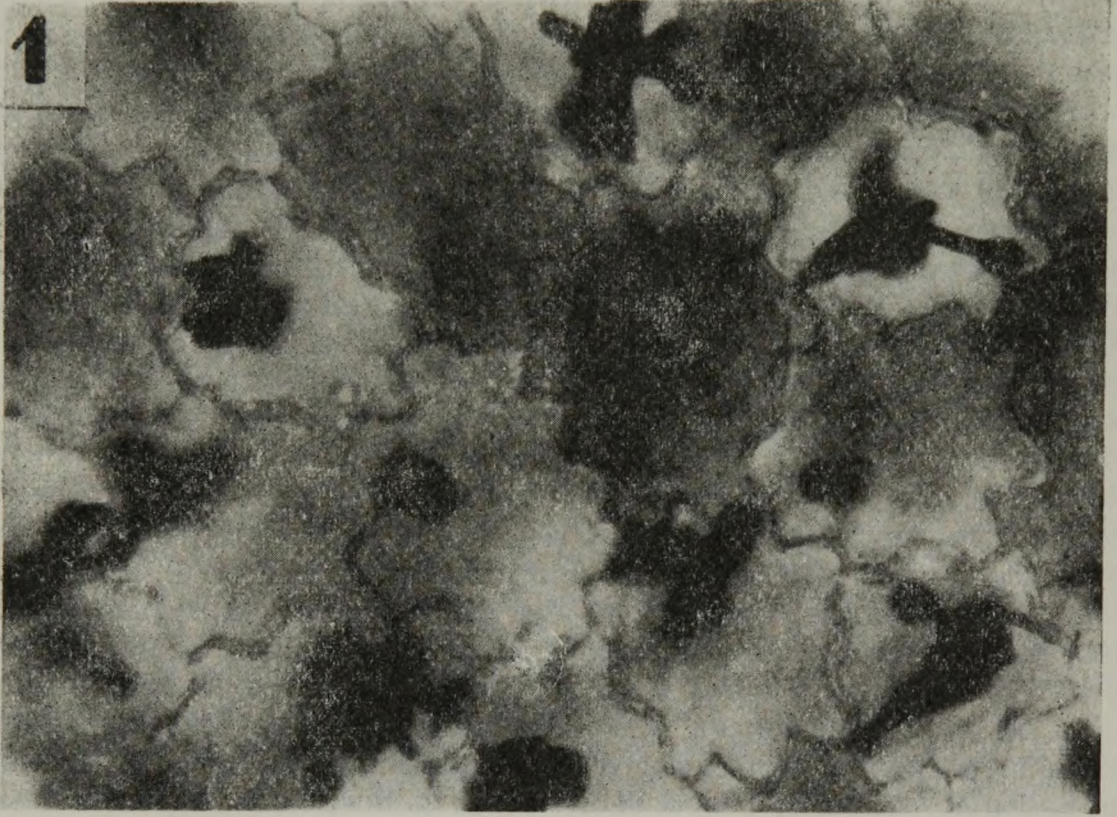
Nos expériences clarifient aussi le problème „d'autoréproduction par bourgeonnement“ de I. POLITIS. Est-ce qu'on observe au début et évolutif, le processus de la coloration vitale et pas qu'après 20—24 heures de l'administration du colorant, nous constatons que quelques corpuscules n'arrivent point à fusionner intégralement dans une grande sphère, ou s'agglutiner dans un staphyloïde ; mais ils restent solitaires. Ces corpuscules ont restés plus ou moins complets, en dehors du processus de fusion ou d'agglomération. L'expérience de M. KEUL et G. LAZĂR prouve que le processus de fusion est fini, consolidé, approximatif après 8—12 heures à partir du début de l'expérience, et davantage après 20—24 heures.

Nous rendrons encore quelques détails de nos expériences dignes de les souligner.

Dans le cas des pétales de *Verbascum phlomoides* en général se sont formés plus des corpuscules de forme cristalline et plus rarement de forme sphérique (Pl. I, fig. 1, 2, 3). Par l'utilisation des grandes dilutions,

PLANCHE I

Fig. 1, 2, 3. Des aspects observés après la coloration vitale avec du bleu de méthyle dans l'épiderme des pétales de *Verbascum phomoides* (Fig. 1 et 2, conc. sol. 1/10.000, temps de 24 heures ; obj. 40, oc. F. II ; et dans la Fig. 3, conc. 1/100.000, temps de 48 heures ; obj. 20, oc. F. II).



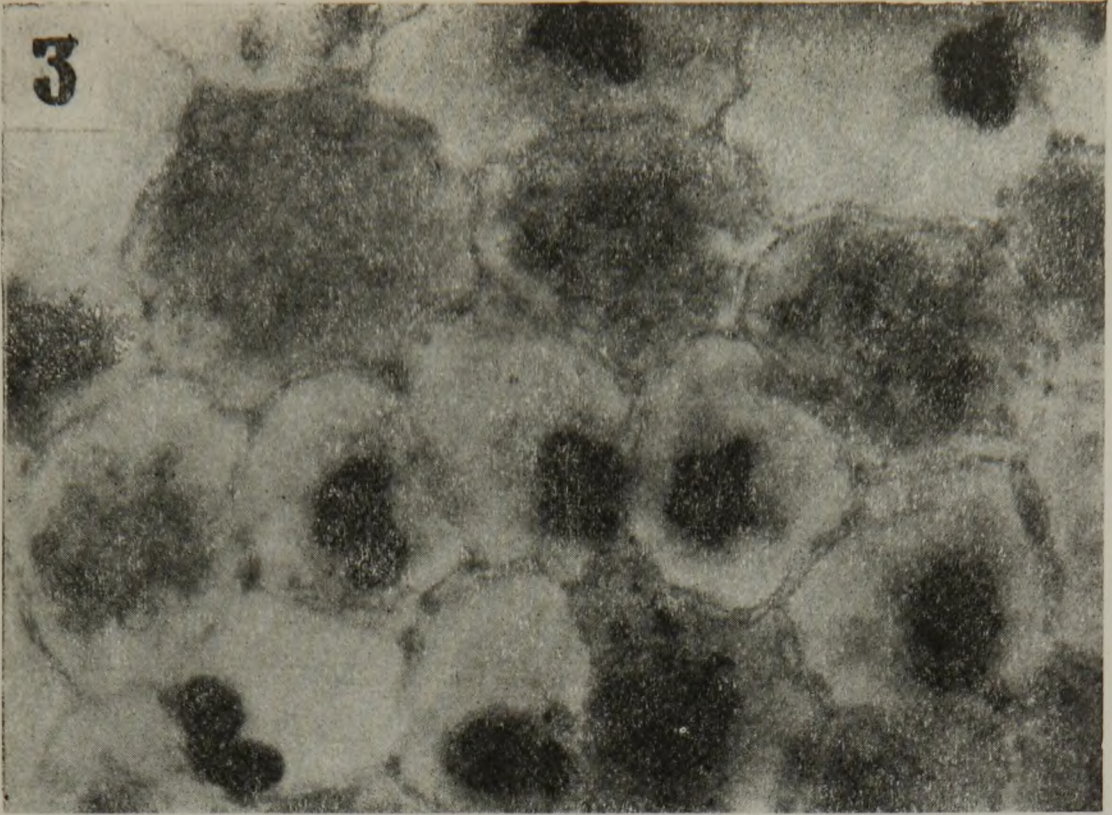
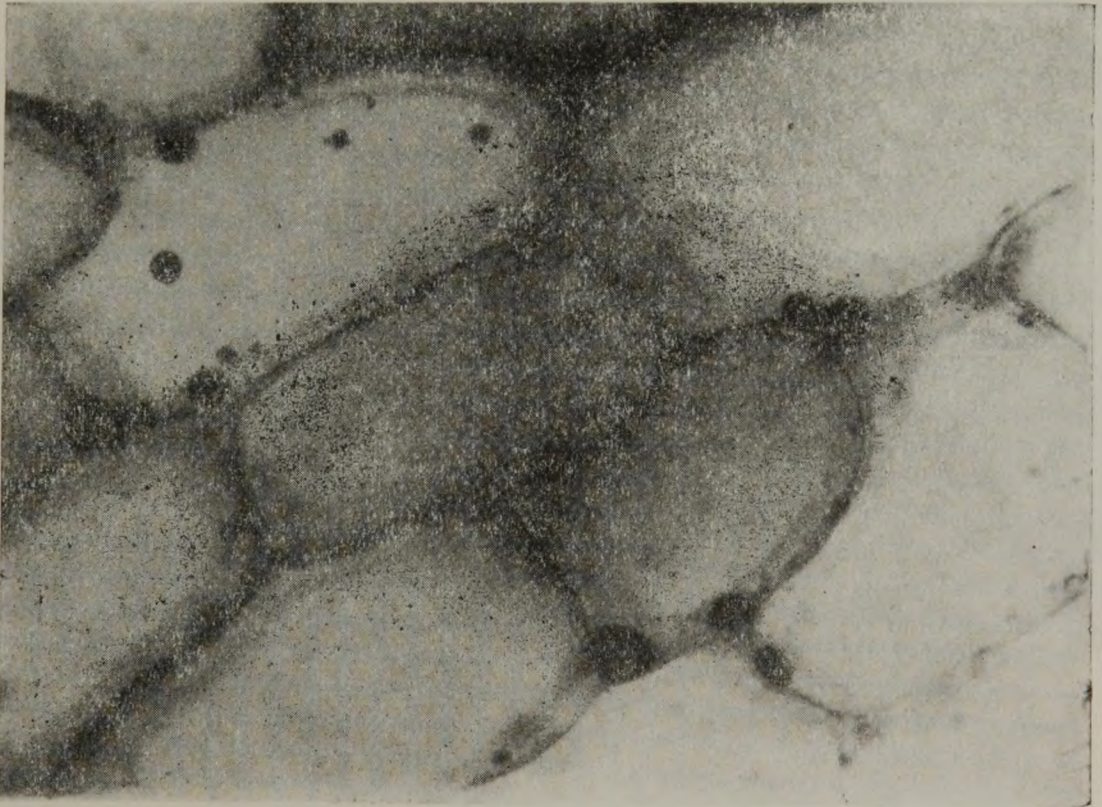


PLANCHE II

Fig. 3, 4, 5. Des aspects de la coloration vitale avec du bleu de méthylen, dans l'épiderme de *Verbascum phlomoides* (conc. sol. 1/10.000, temps de 24 heure, obj. 40,oc.F II). On observe la migration des corpuscules des vacuoles au cytoplasme.



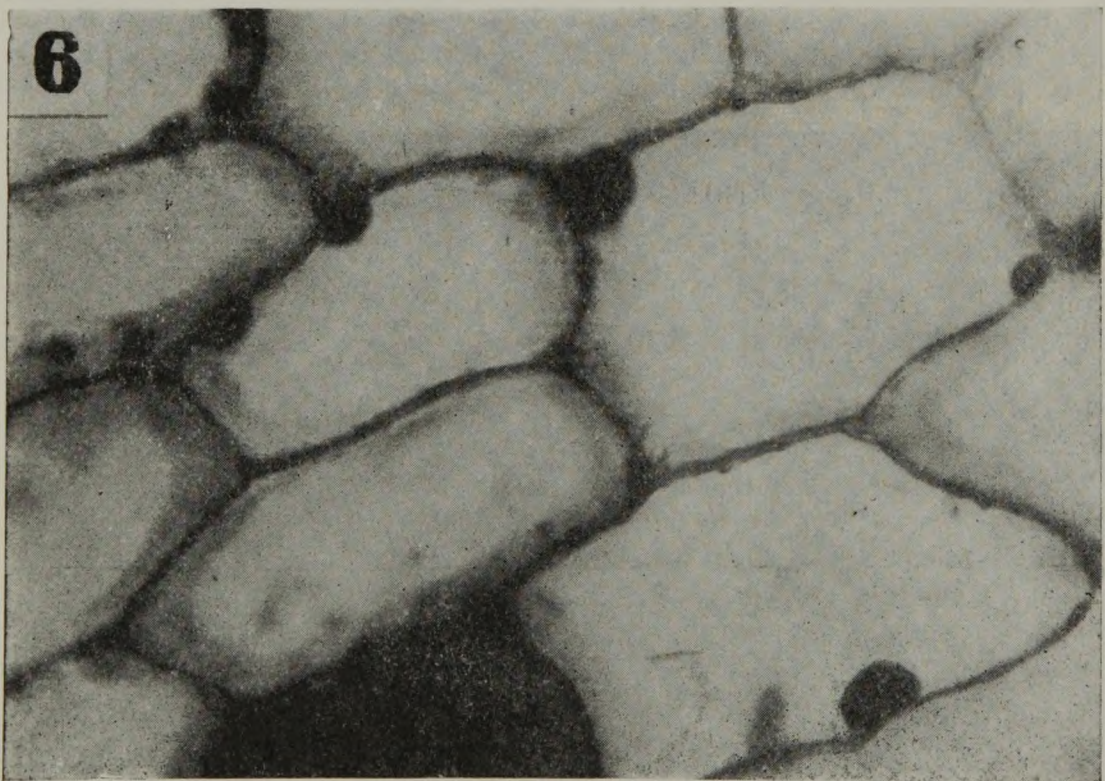
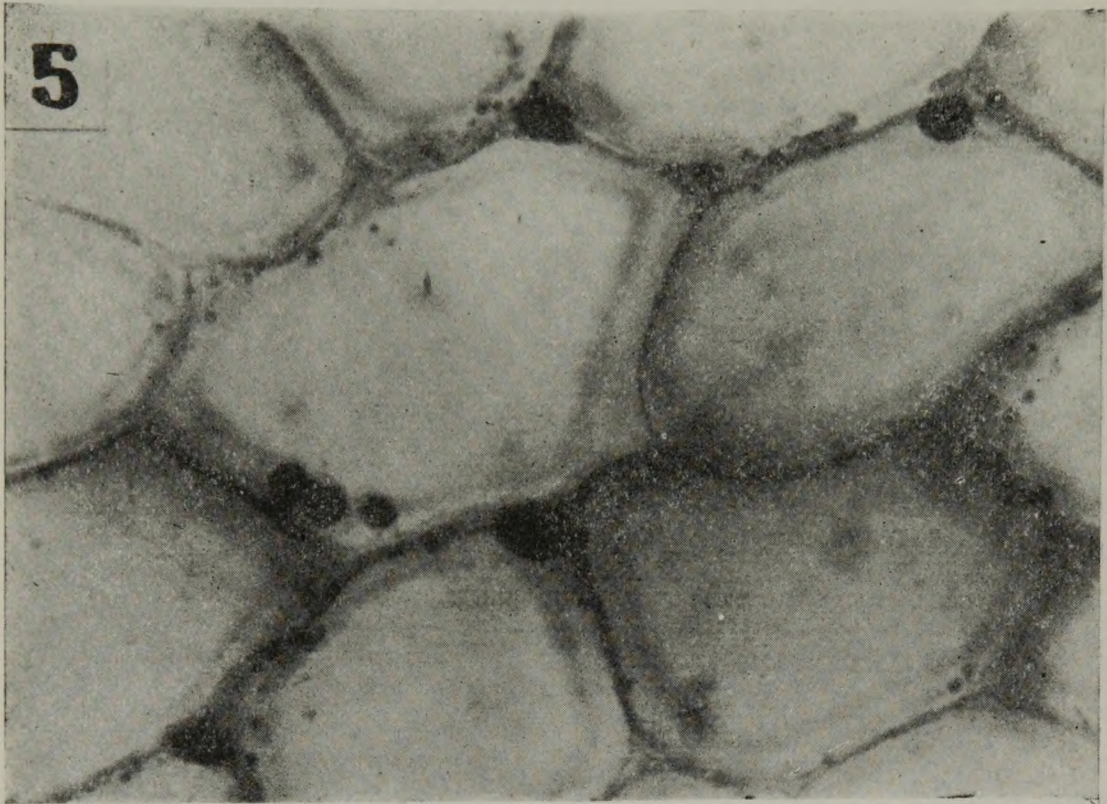
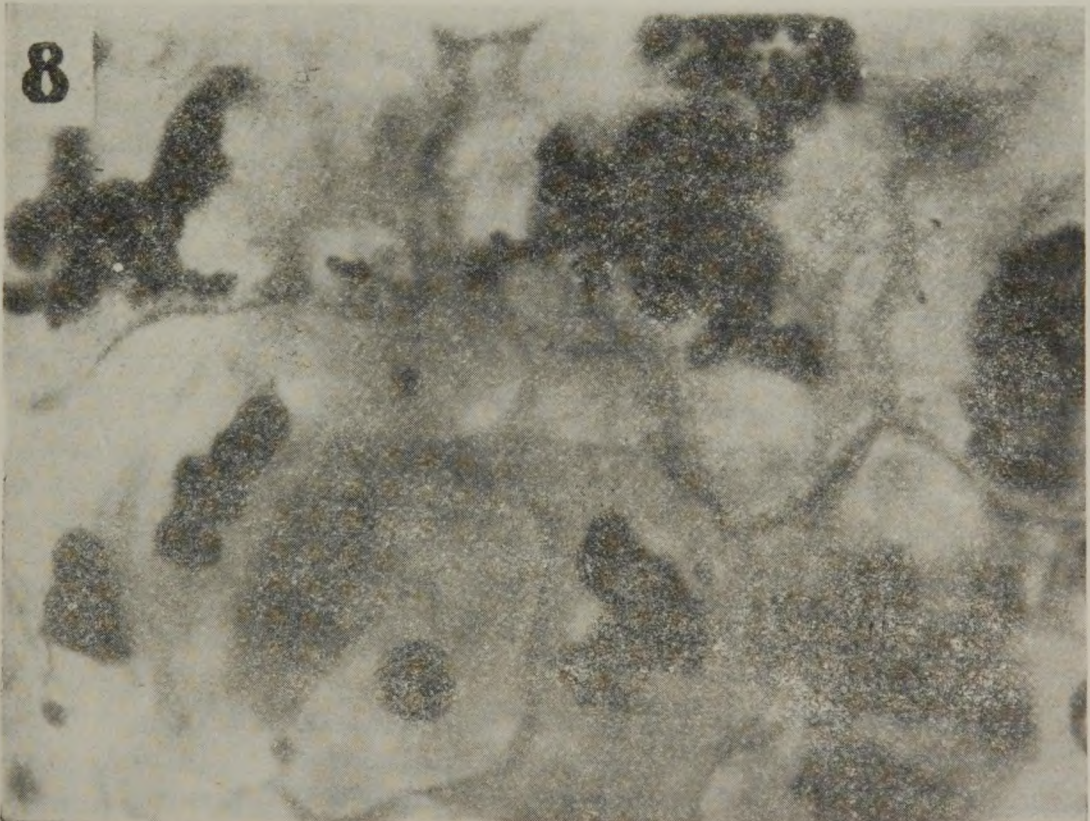
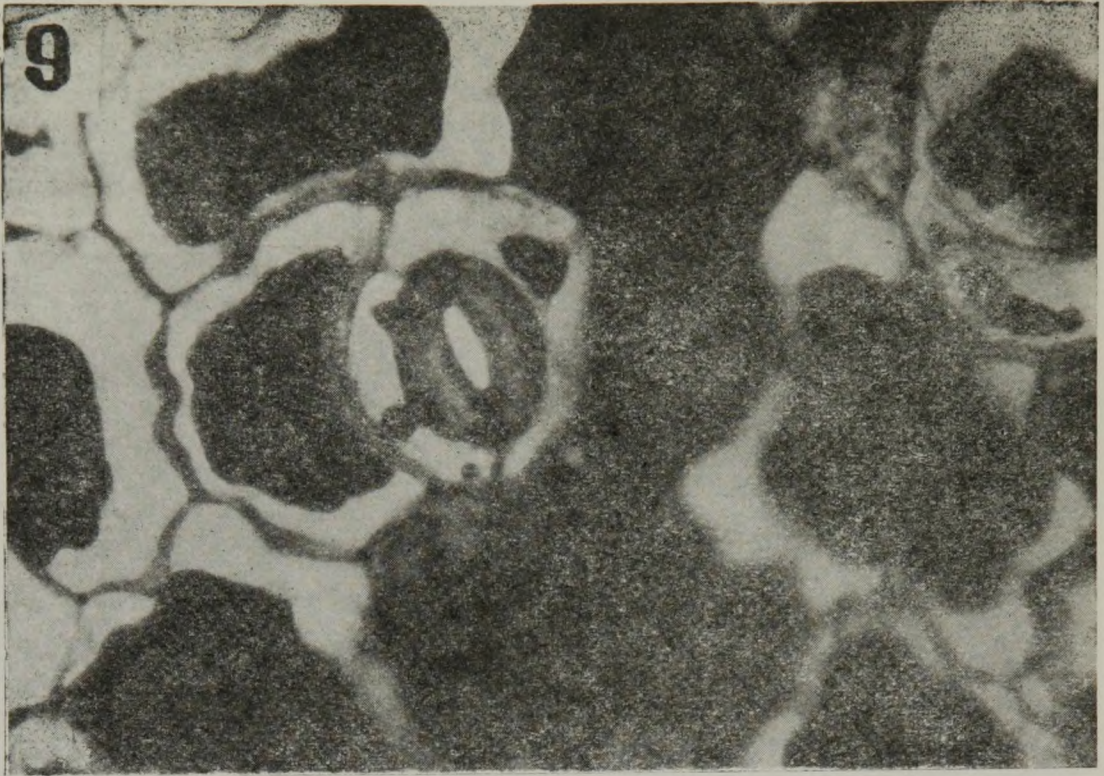


PLANCHE III

Fig. 6, 7, 8, 9. Cellules épidermales de feuilles de *Convolvulus arvensis*, observées après la coloration vitale avec du bleu de méthyle (conc. sol. 1/10.000). Fig. 5 et 6 après 6 respectivement 12 heures de coloration, et la Fig. 7 après du 24 heures de mentien dans le colorant. On remarque la présence du phénomène de la contraction de la vacuole.





de 1/100.000 et à un pH tr/s alcalin (11,2), à coté des corpuscules colorés, dans l'épiderme des pétales se forment aussi de nombreuses figures mie-
liniques qui remplent complètement la vacuole (Pl. I. fig. 3). Elles ont le plus souvent, le contour d'une sphère incolore avec une double membrane bleue. Dans les dernières heures d'observation (24—28 h) on s'aperçoit la localisation de quelques corpuscule sphériques dans le cytoplasme (Pl. II, fig. 4, 5, 6 ; Pl. III, fig. 7). Le processus a lieu en traverse du tonoplaste par les sphères colorées, partant de la vacuole vers le cytoplasme dans une manière identique aux faits notés dans une autre occasion par E. POP et V. SORAN (9) à *Galanthus nivalis* où on a utilisé le rouge neutral dans l'expérience.

À *Convolvulus arvensis* au lieu de cristaux, se forment plus souvent des corpuscules sphériques bleu foncés. Leur souche est la multitude des corpuscules ponctiformes initiales qui s'augmentent en des vacuoles par l'addition du matériel et après, par colarescence. Au fin, s'y forme soit un corpuscule sphérique, soit des corpuscules sphé-
roidales, reunis en des formations de type dendritique et staphyloïdique, conforme la terminologie du E. BOLAIJ (1) et d'E. POP (8) (Pl. III, fig. 8, 9).

CONCLUSION

1. On est prouvé que les formations ainsi dénommées, „chlorogono-
plastés“ par I. POLITIS, ne sont pas des plastés mais des corpuscules vacuolaires, résultats d'habitude, en des maintes types de jus cellualir

(„plines“), par la réaction d'un colorant vital basique avec les substances diffusées en préalable dans le jus cellulaire.

2. Les corpuscules parcourent un processus de fusions et d'agglomération, mûr, déjà dans les premières heures et consolidés bien en avant de 24 h. „Le bourgeonnement“ ou leur „autoréproduction“ est excluse, Ils n'ont pas une structure comme les organites cellulaires et dans des maintes conditions se résoudrent de nouveau dans le jus cellulaire (par exemple pendant la plasmolyse). A leur composition chimique participe non seulement l'acide chlorogénique.

Par conséquence, il faut radier de la terminologie cytologique les „chlorogonoplastes“ de I. POLITIS.

BIBLIOGRAPHIE

1. BOLAIJ, E., — *Die Vitalfärbung voller Zellsäfte und ihre cytochemische Interpretation*. Sitzber. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abl. I., Wien, 1960, Bd. 169, p. 264—317.
2. DRAWERT, H., — *Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung*, in H. RUHLAND *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. 1956, Bd. II. p. 252—289.
3. DRAWERT, H., STRUGGER, S. — *Zur Frage der Methylenblauspeicherung in Pflanzenzellen*. Ber. Dtsch. Bot. Ges., 1938, Bd. 56, p. 43—54.
4. KEUL, G. M., LAZÄR, GEORGETA, — *Bemerkungen über die Entmischungsvorgänge bei Verbascum ovalifolium Donn. nach Vitalfärbung*. Revue Roum. de Biol. Sér. Botanique 1968, t. 13, p. 209—213.
5. POLITIS, I., — *Recherches cytologiques sur le mode de formation de l'acide chlorogénique*. Revue de Cytologie et Cytophysiologie végétale. 1948, X, p. 229—231.
6. — — *Untersuchungen über die cytologische Bildung der Chlorogensäure bei einigen Kompositen*. Protoplasma, 1958, XLIX/1, p. 11—17.
7. — — *Untersuchungen über die cytologische Bildung der Chlorogensäure bei einigen Scrophulariaceen und Convolvulaceen*. Flora, 1964, Bd. 155, p. 3—9.
8. POP, E., — *Colorații vitale la Potamogetonacee* (Comunicare preliminară) (cu rezumat lb. rusă și franceză). Academia Rep. Pop. Rom. Omagiul lui Traian Săvulescu cu prilejul împlinirii a 70 de ani, 1959, p. 617—631.
9. POP, E., SORAN, V., — *Untersuchungen über die in den Zellen nach einer Vitalfärbung zu beobachtenden Körperchen und über die Bedeutung von Vakuolensubstanzen für deren Entstehung*. Flora, 1962, Bd. 152, p. 91—112.
10. KÜSTER, E., HÖFLER, R., — *Die Pflanzenzelle*. III. Aufl. 1956, Jena.
11. STRUGGER, S. — *Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanzen*. 1949. II. Aufl.

COLORAȚIUNEA VITALĂ CU ALBASTRU DE METILEN
LA VERBASCUM PHLOMOIDES ȘI CONVOLUVULUS ARVENSIS.

Rezumat

Autorii studiază prin colorațiuni vitale cu albastru de metilen formațiunile denumite de *I. Politis* „chlorogonoplastes“ și dovedesc că acestea nu sînt plastide, ci corpuscule vacuolare a unor tipuri de suc celular, care apar obișnuit drept rezultat în urma reacțiilor unui colorant vital bazic cu substanțele difuzate în prealabil în sucule celular. Autorii propun drept urmare ștergerea termenului de „chlorogonoplastes“ din terminologia citologică.