Recherches cytophotométriques sur la présence et la localisation des noyaux polyploïdes dans les racines de *Vicia faba L*.

K. GRZYCKA

Les recherches de Geitler (1940, 1953) et de son école ont démontré qu'en plusieurs cas les cellules polyploïdes se forment en résultat des endomitoses. Ces travaux ont donné l'image morphologique des transformations ayant lieu durant ce processus dans les noyaux cellulaires. Ces recherches ont également démontré que la présence des noyaux endopolyploïdes est liée aux zones de différenciation des tissus ou aux tissus déjà différenciés.

D'autre part, les dosages biochimiques portant sur les noyaux des racines (Holmes et coll. 1955; Konarew 1955; Jensen 1955, 1956, 1953; Sunderland et McLeish 1961; Maroti 1963), de même que les examens cytophotométriques (Deeley et coll. 1957; McLeish et Sunderland 1961; Rodkiewicz 1961; Yokomura 1962), mettent en évidence l'augmentation de la teneur en acide désoxyribonucléique au fur et à mesure de la différenciation, ce qui indique la présence dans ces zones des noyaux au nombre de chromosomes multiplié.

Vu que les recherches faites jusqu'à présent ne concernaient que le méristème des racines (Tschermak-Woess, Doleżal-Janisch 1956; Jensen 1958; Yokomura 1962) et que les quantités de DNA étaient définies comme une fonction de la longueur de la racine (Holmes et coll. 1955; Deeley et coll. 1957; Jensen 1956; Sunderland et McLeish 1961), nous nous sommes proposés d'étudier la teneur en DNA dans les noyaux des racines de *Vicia faba* L. — de la zone mèristématique jusqu'aux tissus différenciés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nos observations ont porté sur les racines primaires de *Vicia faba* L. Les graines ont été mises en germination à la temp. 20—22°C, dans de l'eau de robinet. Aprés 10—11 jours, les racines d'une longueur de 15—16 cm ont été fixées dans un mélange d'éthanol absolu et d'acide acétique glacial (3:1).

Les coupes longitudinales à la paraffine, d'une épaisseur de 10 μ , ont été soumises à l'hydrolyse pendant 6 min. dans 1N HCl à la temp. 60°C,

ensuite traitées pendant 1,5 h par le réactif de Schiff et rincées dans trois bains sulfureux.

En même temps, comme contrôle, on préparait du méristème des frottis, en procédant de façon identique.

On a étudié les noyaux de l'écorce et du cylindre central des racines divisées, à partir du sommet, en cinq secteurs suivants: 0—1, 1—2, 2—3, 3—5 et 5—8 mm.

Le degré de la polyploïdie des noyaux était mesuré à base du contenu de DNA défini par la méthode cytophotométrique conformément aux principes admis. On se servait du Schnellphotomètre de Zeiss, type II. Chaque coupe analysée était photographiée. Sur les microphotographies on marquait les noyaux qui étaient ensuite soumis aux dosages photométriques; ce procédé nous a assuré la localisation précise du noyau sur le territoire de la racine. Les mesurages des surfaces des noyaux, à base de leur diamètre ou de leur axe, ont été faits sur les mêmes microphotographies. Les valeurs relatives de DNA dans le noyau ont été calculées par la multiplication de la valeur de l'extinction par la surface du noyau. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux et les histogrammes.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

La localisation des noyaux polyploïdes le long de la racine ne peut être constatée que sur les coupes à la paraffine, car les frottis, généralement admis dans la cytophotométrie, ne permettent pas une observation exacte de la localisation des cellules examinées dans l'organe. Afin de définir la quantité de DNA correspondant à la valeur 2c, on a fait des dosages photométriques du contenu de DNA sur les frottis du méristème de racine. On éliminait ainsi la source éventuelle de l'erreur qui pourrait consister en fait d'avoir découpé un fragment du noyau par le rasoir du microtome. Pour cette raison ces résultats servaient de point de départ tant pour le calcul de la quantité de DNA dans les noyaux des racines examinées que pour la classification des noyaux aux groupes particuliers du contenu de DNA.

Sur l'histogramme (fig. 1) présentant la localisation de DNA dans les noyaux des frottis on voit trois classes de noyaux: première — au contenu de DNA de 5 à 7, deuxième — de 8 à 11 et troisième — de 12 à 14. La moyenne arithmétique du contenu de DNA pour la première classe égale 6,8; celle pour la deuxième — 9,7; celle pour la troisième — 13,4. Vu que la troisième classe en contient le double en comparaison de la première, on a admis que la première représente les noyaux diploïdes (periode G_1), la troisième — les noyaux tetraploïdes (période G_2), tandis que la seconde — les noyaux synthétisant DNA actuellement (période S).

À base des calculs ci-dessus on définissait, dans la suite des recherches, le contenu de DNA correspondant aux noyaux diploïdes (2c), tetraploïdes (4c), octoploïdes (8c) et le contenu de DNA correspondant aux noyaux du rang 16c. On classifiait également les noyaux des groupes intermédiaires, c.-à-d. synthétisant DNA actuellement.

Nornbre de noyaux 10 Fig. 1. Histogramme du conquantité de DNA

tenu de DNA dans les noyaux des frottis des méristèmes radiculaires de Vicia faba L.

La confrontation des histogrammes du secteur 0-1 mm, obtenus au cours de l'examen des frottis et des coupes (v.: fig-s 1 et 2, tabl-x 1 et 2) démontre l'identité des résultats des recherches faites sur le matériel préparé de deux méthodes différentes, Vu cela, les résultats obtenus dans les examens des coupes qui nous servaient dans la suite de notre travail, correspondent aux rapports quantitatifs de DNA des noyaux.

Tableau 1 Nombre de noyaux à un contenu de DNA divers, de la zone 0-1 mm de la racine (frottis)

Nombre total de noyaux	Nombre de noyaux dans les classes particulières											
	2c	%	intermé- diaire	%	4c	%						
45	15	33,3	9	20,0	21	46,7						

Tableau 2 Nombre de noyaux à un contenu de DNA divers dans l'écorce des racines examinées de Vicia faba L.

Distance du sommet en mm	Nombre	Nombre total de noyaux	Nombre de noyaux dans les classes particulières de DNA											
	de racines		2c	%	intermé — diaire	%	4c	%	intermé— diaire	%	8c	%		
	3		115	32,0	76	21,0	169	47,0						
1—2	3	360	112	31,0	61	17,0	170	47,0	17	5,0				
2—3	3	280	92	33,0	29	10,3	120	43,0	37	13,0	2	0,7		
3—5	5	540	119	22,0	50	9,0	221	41,0	139	26,0	11	2,0		
5—8	5	480	108	22,5	40	8,3	218	45,4	105	21,9	9	1,9		

Le nombre de noyaux dans les classes particulières dans la zone 0—1 mm des frottis et des coupes est présenté dans les tabl-x 1, 2 et 3.

Dans les racines examinées, dans l'écorce du secteur 0-1 mm (tab. 2), les noyaux de la classe 2c font 32%, ceux de la classe 4c-47%, et les noyaux intermédiaires -21% du total des noyaux ayant été objet des mesurages. La valeur moyenne de DNA par un noyau de la classe 2c égale 6.8-7.9, tandis que celle dans la classe 4c-13.3-15.4. Dans les secteurs suivants (1-2 et 2-3 mm), le nombre de noyaux de la classe 2c fait 31-33%, celui de la classe 4c-43-47%, et l'on observe la diminution du nombre de noyaux à des valeurs intermédiaires entre 2c et 4c, qui, dans le secteur 2-3 mm ne font que 10.3%. En plus, dans ce secteur apparaissent des noyaux à une valeur de DNA supérieure à celle de la classe 4c et atteignant la valeur de la classe 8c. Ils font ensemble 5-13%.

Tableau 3

Nombre de noyaux à un contenu de DNA divers dans le cylindre central des racines examinées de *Vicia faba* L.

Distance du sommet en mm	Nom-	Nom- bre to-	Nombre de noyaux dans les classes particulières de DNA													
	tal de	2c	%	inter- méd.	%	4c	%	inter- méd.	%	8c	%	inter- méd.	%	16c	%	
0—1	3	180	47	26,1	34	18,6	86	47,8	12	6,6	1	0,6				
1-2	3	180	50	27,8	26	14,4	82	45,6	21	11,6	1	0,6				
2—3	3	180	48	26,7	22	12,2	84	46,7	24	13,3	2	1,1				
3—5	5	390	76	19,5	35	9,0	142	36,4	109	27,9	20	5,1	7,0	1,8	1,0	0,3
5—8	5	246	57	23,2	28	11,3	92	37,1	60	24,4	9	4,0				

Le secteur 3—5 mm est caractérisé par la suite de la diminution du nombre de noyaux de la classe intermédiaire entre 2c et 4c et l'augmentation considérable du nombre de noyaux à un contenu de DNA dépassant la valeur de la classe 4c (28%). Cet état se maintient dans l'écorce, avec de faibles variations dans le secteur suivant, celui de 5—8 mm, ce qui est présenté dans le tab. 2 et les histogrammes (fig. 2).

Dans le cylindre central pourtant c'est déjà dans le secteur 0—1 mm (tab. 3 et fig. 3) qu'apparaissent de rares noyaux au contenu de DNA supérieur à 4c. Dans les secteurs suivants (1—2 et 2—3 mm) le nombre de ces noyaux augmente peu à peu, pour atteindre, dans le segment 3—5 mm, la valeur la plus grande qui, pour la classe intermédiaire entre 4c et 8c égale 27,9%, tandis que pour la classe 8c — 5,1%. Dans ce secteur on a constaté la présence des noyaux à des valeurs de DNA supérieures à 8c et arrivant à 16c. Pareillement à l'écorce, au fur et à mesure qu'on s'éloigne du sommet de la racine, le nombre de noyaux de la classe entre 2c et 4c diminue de 18,9% dans le premier secteur jusqu'à 9% dans celui

de 3—5 mm. Dans le segment 5—8 mm se fait observer, dans le cylindre central, la diminution du nombre de noyaux au contenu de DNA supérieur à 4c (tab. 3 et fig. 3).

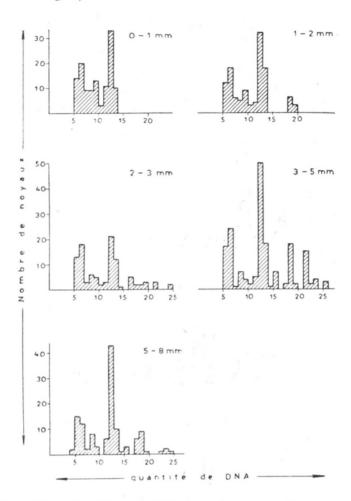


Fig. 2. Histogrammes du contenu de DNA dans le noyaux de l'ecorce des préparations coupées des secteurs successifs de la racine de Vicia faba L.

La présence des classes intermédiaires entre 4c et 8c et entre 8c et 16c dans les zones dépourvues d'activité mitotique indique que, dans ces cas, la synthése de DNA est liée à l'endomitose.

Une confrontation réciproque des résultats obtenus pour les racines examinées, qui est présentée sur les diagrammes (fig. 4) où l'on a marqué le contenu en $^{9}/_{0}^{0}/_{0}$ des noyaux sur l'ordonnée, a permis de faire l'analyse générale ci-dessus, car on avait constaté que les différences entre les racines particulières ont seulement le caractère quantitatif, et non pas qualitatif.

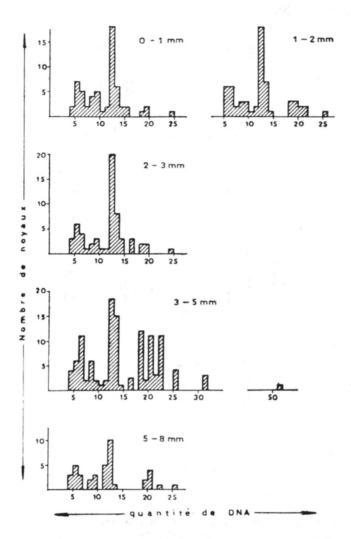


Fig. 3. Histogrammes du contenu de DNA dans les noyaux du cylindre central des préparations coupées des secteurs successifs de la racine de *Vicia faba* L.

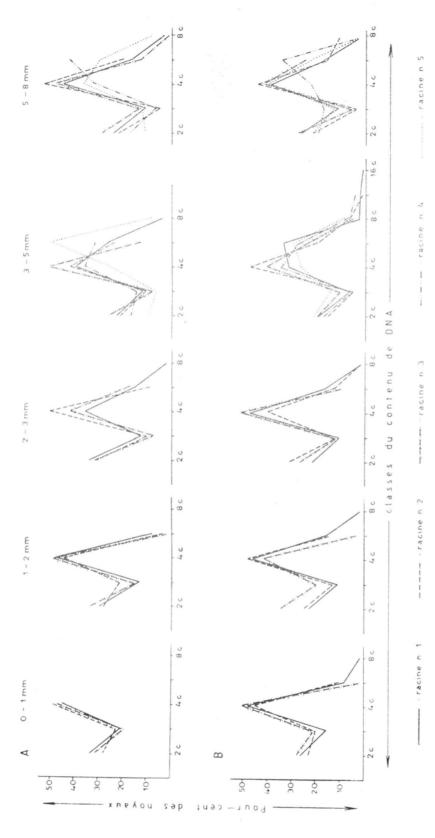


Fig. 4. Comparaison réciproque des résultats obtenus pour les racines examinées. A - écorce; B - cylindre central

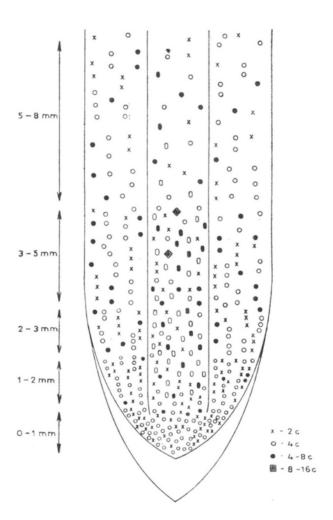


Fig. 5. Répartition des noyaux aux différentes quantités de DNA dans la racine de Vicia faba L.

La répartition des noyaux des classes particulières du contenu de DNA est présentée sur la fig. 5. Les nombres de noyaux des classes particulières, marqués sur la schéma, égalent environ 50% de la moyenne arithmétique du nombre de noyaux de trois racines examinées, avec la prise en considération de la localisation de chaque type des noyaux dans les secteurs examinés.

DISCUSSION

La présence et la répartition des noyaux polyploïdes dans les racines constituait l'objet des recherches morphologiques de nombreux auteurs. Holzer (1952) a examiné l'apparition des mitoses polyploïdes sous l'influence de divers régulateurs de croissance dans les racines des plantes de diverses espèces, ayant fait une attention particulière à l'écorce et au cylindre central de la racine. Il a constaté que la localisation des mitoses polyploïdes dans la racine n'est pas identique. Les mitoses tetra- et octoploïdes peuvent être présentes dans les couches diverses de l'écorce et du cylindre central ou bien se borner seulement aux couches définies. Les recherches faites par Tschermak-Woess et Dolezal (1953), de même que par Geitler (1953) et bien d'autres, ont démontré qu'il y a des espèces de plantes aux racines ne contenant que les tissus diploïdes, tandis que les autres atteignent, au cours de la différenciation de la racine, les degrés de ploïdie divers — de 2n à 16n — surtout dans l'écorce et dans le cylindre central.

En plus, Doleżal et Tschermak-Woess (1955) ayant fait les recherches sur la racine de *Rhoeo discolor*, ont défini dans quels secteurs de la racine en développement apparaissent les premières endomitoses et où sont-elles le plus nombreuses.

Les résultats du travail présent, relatifs à la présence des noyaux à 2c et 4c de DNA dans le méristème de la racine de Vicia faba L., s'accordent parfaitement avec ceux des travaux de Tschermak-Woess et Doleżal-Janisch (1956), obtenus par la méthode morphologique, avec ceux des travaux de Mc Leish et Sunderland (1961), de même que Yokomura (1962), obtenus par les méthodes cytophotométriques, ainsi qu'avec ceux des analyses biochimiques (Jensen 1958, Sunderland et Mc Leish 1961). Il manque de recherches détaillées se rapportant aux zones situées au-dessus du méristème. Les données de Holzer (1952), concernant les racines de Vicia faba L., sont très générales et ne précisent pas le degré de polyploïdie des noyaux. Ce sont uniquement les recherches biochimiques (Holmes et coll. 1955, Sunderland et Mc Leish 1961) et cytophotométriques (Deeley et coll. 1957, Mc Leish et Sunderland 1961), mettant en évidence l'augmentation du contenu de DNA avec

l'éloignement du sommet de la racine de Vicia faba L., qui permettent de juger que dans ces secteurs le degré de polyploïdie des noyaux augmente.

Les résultats de nos recherches démontrent la présence des noyaux des classes 2c, 4c, 8c dans l'écorce au-dessus de 1 mm, de même que des noyaux des classes 2c, 4c, 8c, parfois même 16c, dans le cylindre central; dans celui-ci pourtant les noyaux au contenu de DNA dépassant 4c apparaissent déjà dans le premier secteur (0—1 mm).

Les différences que nous avons observées et qui se rapportaient au niveau où apparaissent les noyaux endoploïdes dans l'écorce et dans le cylindre central s'accordent bien avec les résultats des recherches de Doleżal et Tschermak-Woess (1955) concernant les racines de Rhoeo discolor, dans lesquelles les premières endomitoses apparaissent dans les parties du méristème les plus éloignées du sommet de la racine et passent parallèment avec les mitoses, atteignant leur activité maximum dans la zone d'allongement. D'autre part, Jensen (1955, 1956) a constaté que dans la racine de Vicia faba L. le processus d'allongement des cellules du cylindre central débute à la longueur ca 800 µ en partant du sommet, tandis que celui des cellules d'écorce — à la longueur ca 1700 μ. De la confrontation des données fournies par la littérature et de nos résultats s'ensuit que l'allongement, au moins de certaines cellules, est strictement lié avec l'augmentation de la quantité de DNA dans les noyaux qui y sont contenus. Les recherches détaillées, prenant en considération les dimensions de la cellule dont le DNA nucléaire est mesuré par les méthodes cytophotométriques, pourraient fournir des informations précises relativement à la corrélation de ces deux processus: celui de l'augmentation du contenu de DNA dans les novaux et celui de l'agrandissement des dimensions de la cellule.

Comme le démontrent nos résultats, les noyaux polyploïdes sont les plus nombreux, tant dans l'écorce que dans le cylindre central, dans le secteur 3-5 mm. Pourtant, dans le segment 5-8 mm leur nombre diminue insensiblement, et ce fait mérite une attention particulière. Quant au cylindre central, la diminution du nombre de ces noyaux peut résulter de la dégénération des noyaux du système conducteur. Cette interprétation ne peut pourtant pas être appliquée par rapport à l'écorce. Dans ce cas la diminution du contenu de DNA en comparaison au secteur 3—5 mm pourrait avoir deux causes: 1° — ce serait un artéfact dû à la technique de préparation des coupes au microtome, en résultat duquel, ce qui est très probable, les fragments marginaux de grands noyaux auraient pu être rejetés, provoquant la diminution de la valeur de DNA; 2° — ce serait l'expression de la régularité dans l'ontogenèse de la racine consistant à un arrêt périodique de la polyploïdisation endomitotique. Cela pourrait confirmer les observations relatives à Rhoeo (Doleżal et Tschermak-Woess 1955), selon lesquelles, après une grande activité dans la zone d'allongement dans les parties plus âgées de la

racine, se fait remarquer le manque de symptômes de l'activité endomitotique.

La diminution de la quantité totale de DNA dans le secteur au-dessus de 4 mm chez *Vicia faba* L. a été démontrée par les méthodes biochimiques par Sunderland et Mc Leish (1961).

Il se peut que la première source des noyaux tetraploïdes dans les zones où l'activité mitotique disparaît (au-dessus de 1 mm) soit constituée par les noyaux ayant le cycle intermitotique normal, c.-à-d. ceux qui sont complètement prêts à une mitose suivante. L'absence d'un facteur hypothétique libérant la mitose dans ces tissus pourrait être la cause de ce qu'ils ne se divisent pas et restent au niveau 4c. Les noyaux de ce type prédominent (plus de $40^{\circ}/_{\circ}$ — v. tabl. 2) dans la population de noyaux de l'écorce examinée dans tous les secteurs. La première étape d'enrichissement des noyaux en DNA se passerait de cette façon-là. La suite de l'augmentation de DNA dans les noyaux, conduisant à l'enrichissement du tissu entier en ce composé, se réalise par la voie d'une nouvelle replication de DNA (v. classes intermédiaires — tableaux 2 et 3), ayant lieu déjà au-dessus du méristème.

RESUME

On examinait, par la méthode cytophotométrique, après la réaction de Feulgen, le contenu de DNA dans les cellules de l'écorce et du cylindre central dans les secteurs suivants des racines de *Vicia faba* L.: 0—1, 1—2, 2—3, 3—5 et 5—8 mm.

Le degré de polyploïdie des noyaux était défini à base du contenu de DNA. Les résultats obtenus pour les préparations coupées du secteur 0—1 mm étaient confrontés, pour le contrôle, avec ceux des mesurages photométriques des noyaux des frottis. Les données numériques, caractérisant la localisation des noyaux polyploïdes dans les racines examinées, présentées dans les tableaux et les histogrammes, démontrent l'existence des noyaux des classes 2c, 4c et 8c dans l'écorce de la racine au-dessus de 1 mm et de ceux des classes 2c, 4c, 8c et parfois 16c dans le cylindre central. Les noyaux à un contenu de DNA supérieur à 4c apparaissent dans le cylindre central plus tôt que dans l'écorce.

La présence des noyaux à un contenu de DNA intermédiaire entre 4c et 8c, de même qu'entre 8c et 16c, dans les tissus ne subissant pas la division, prouve que la synthèse de DNA est liée ici à l'endomitose.

Je voudrais présenter à Mme le prof. agrégé dr Marie Olszewska l'expression de mes meilleurs remerciements et de toute ma gratitude pour son aide bienveillante, ainsi que pour ses valeureuses indications dont elle a bien voulu me servir pendant l'élaboration de ce travail.

Laboratoire de Botanique de la Faculté de Pharmacie de l'Académie de Médecine de Lublin (Pologne) (Reçu: 7.III.1967)

BIBLIOGRAPHIE

- Deeley E. M., Davies H. G., Chayen J., 1957, The DNA content of cells in the root of *Vicia faba*, Expt. Cell Res. 12:582—591.
- Doleżal R., Tschermak-Woess E., 1955, Verhalten von Eu- und Heterochromatin und interphasisches Kernwachstum bei Rhoeo discolor. Vergleich von Mitose und Endomitose, Österr. Bot. Z., 102:158—185.
- Geitler L., 1940, Die Polyploidie der Dauergewebe Höheren Pflanzen, Ber. d. d. Bot. Ges. 58:131—142.
- Geitler L., 1953, Endomitose und Endomitotische Polyploidiesierung, Protoplasmatologia 6:1—89.
- Holmes B. E., Mee L. K. Hornsey S. and Gray L. H., 1955, The nucleic acid content of cells in the meristematic elongating and fully elongated segments of roots of *Vicia faba*, Expt. Cell. Res. 8:101—113.
- Holzer K., 1952, Untersuchungen zur karyologischen Anatomie der Wurzel, Österr. Bot. Z. 99:118—155.
- Jensen W. A., 1955, A morphological and biochemical analysis of the early phases of cellular growth in the root tip of *Vicia faba*, Expt. Cell. Res. 8:506—522.
- Jensen W. A., 1956, On the distribution of nucleic acid in the root tip of Vicia faba, Expt. Cell Res. 10:222—256.
- Jensen W. A., 1958, The nucleic acid and protein content of root tip cells of *Vicia faba* and *Allium cepa*, Expt. Cell Res. 14:575—583.
- Konarew W. G., 1955, O raspredielenii nukleinowych kisłot w toczkach rosta pobiega i kornia, D. A. N. SSSR. t. 102, nr 2:361⊢364.
- Maroti M., 1963. Änderungen des Nukleinsauregehalts in des Polyploiden Wurzelzellen der Futterübe, Acta Bot. Acad. Scien. Hungaricae. 9:105—116.
- Mc Leish J., Sunderland N., 1961, Measurements of deoxyribose nucleic acid (DNA) in higher Plants by Feulgen photometry and chemical method, Expt. Cell Res. 24:527—540.
- Rodkiewicz B., 1961, Zagadnienie stałości poziomu KDN mierzonego fotometrycznie po reakcji Feulgena w różnych komórkach roślinnych, Zesz. Nauk Uniw. Łódzkiego, Seria II, Zesz. 10:83—117.
- Sunderland N. and McLeish J., 1961, Nucleic acid content and concentration in root cells of higher plants, Expt. Cell Res. 24:541—554.
- Tschermak-Woess E. und Doleżal R., 1953, Durch die Seitenwurzelbildung induzierte und spontane Mitosen in den Dauergeweben der Wurzel, Österr. Bot. Z. 100:358.
- Tschermak-Woess E., Doleżal-Janisch R., 1956, Rhytmisches Kernwachstum während der mitotischen Interphase von Vicia faba, Österr. Bot. Z. 103:588—599.
- Yokomura E., 1962, Cytophotometrical Study of DNA in the Root tip of Vicia faba, Cytologia 27(1):424—430.

Badania cytofotometryczne nad występowaniem i rozmieszczeniem jąder poliploidalnych w korzeniach Vicia faba L.

STRESZCZENIE

Metodą cytofotometryczną po reakcji Feulgena badano zawartość DNA w jądrach kory pierwotnej i walca osiowego w następujących odcinkach korzeni *Vicia faba* L.: 0—1, 1—2, 2—3, 3—5 i 5—8 mm.

Stopień poliploidalności jąder określano na podstawie zawartości DNA. Wyniki uzyskane dla preparatów krajanych z odcinka 0—1 mm skonfrontowano dla kontroli z pomiarami fotometrycznymi jąder z preparatów gniecionych. Dane liczbowe, ilustrujące rozmieszczenie jąder poliploidalnych w badanych korzeniach, zestawiono w tabelach i histogramach. Wskazują one na występowanie jąder klasy 2c, 4c i 8c w korze pierwotnej korzenia powyżej 1 mm oraz jąder 2c, 4c, 8c i niekiedy 16c w walcu osiowym, z tym, że w walcu osiowym wcześniej niż w korze pierwotnej pojawiają się jądra o wyższej niż 4c zawartości DNA.

Obecność w tkankach nie dzielących się jąder o zawartości DNA pośredniej między 4c a 8c i 8c a 16c wskazuje, że synteza DNA jest tu związana z endomitotyczną poliploidyzacją.