

Le développement de l'embryon zygotique chez *Vitis vinifera* L.

par

J. VALLADE, J. ALABOUVETTE et A.-M. CHABBERT

The development of the zygotic embryo of *Vitis vinifera* L.

S u m m a r y : The embryonic development of *Vitis vinifera* from the zygote to the mature embryo has been studied. The planes of early cell divisions are irregular, thus leading to formation of a large globular proembryo comprising about 1500 undifferentiated cells above a bulky suspensor. Organogenesis of the embryo starts with initiation of the cotyledons and constitution of the radicular meristem. The intercotyledonary zone, future shoot apex, is formed by about 300 cells. In this zone, cells remain undifferentiated throughout embryogenesis; its organization begins to be completed only after germination. The radicular meristem, on the other hand, is functioning from the embryonic stage. The meristem of the embryonic radicle and the meristem of the adventitious root are identical in their ('open' type) organization.

Key words : embryo, anatomy, meristem, differentiation, growth.

Introduction

Les études embryologiques relatives à *Vitis vinifera* L. ont principalement été consacrées à la microsporogénèse (CARRARO *et al.* 1981; ME *et al.* 1984), à la macrosporogénèse (CARRARO *et al.* 1979) et à la formation du gamétophyte femelle (NEGI et RANDHAWA 1971; KASSEMAYER et STAUDT 1981).

Par contre, les recherches sur l'embryogénèse sont encore limitées et concernent soit la fécondation et les premiers stades du développement embryonnaire (KASSEMAYER et STAUDT 1983), soit l'embryon prélevé au stade de la maturité de la graine (BERNARD 1980). Il en est de même pour les autres espèces du genre *Vitis* ou les autres genres de Vitaceae pour lesquels il n'est qu'exceptionnellement, et dans ce cas succinctement, fait allusion au développement embryonnaire (*Vitis pallida*, NAIR et PARASURAMAN 1962).

L'objet de la présente étude est donc de suivre dans le détail le développement de l'embryon de vigne en mettant en évidence les principales caractéristiques de la segmentation et de l'organogénèse embryonnaire chez cette espèce. Ce travail nous paraît revêtir un double intérêt: d'une part, le modèle *Vitis* présente des particularités que nous serons amenés à discuter dans le cadre général des problèmes de morphogénèse embryonnaire, d'autre part, la description embryogénique que nous présentons pourra constituer un élément de référence utile pour l'interprétation morphologique des faits d'embryogénèse expérimentale (MULLINS et SRINIVASAN 1976; KRUL et WORLEY 1977; BESSIS 1986).

Matériel et méthodes

Le matériel végétal a été prélevé entre juin et septembre dans le vignoble du domaine de l'Université de Bourgogne (cépage Pinot, clone 113). Les fleurs et graines

ont été fixées par le mélange FPA (formaldéhyde, 5 % — acide propionique, 5 % — alcool 70°, 90 %) puis incluses en paraffine. Les coupes, effectuées à 5 et 7 μm d'épaisseur, ont été colorées selon la technique de SHARMAN (1943) ou par la réaction nucléale de Feulgen suivie d'une contre coloration au bleu d'aniline.

Les dessins ont été réalisés à la chambre à dessiner du microscope. Pour chaque type cellulaire, les deux dimensions moyennes (longueur L et largeur l) sont calculées à partir de 15—25 mesures. Pour l'évaluation du volume cellulaire, chaque type de cellule a été assimilé à un parallélépipède droit à section carrée, la troisième dimension, non directement mesurable, étant arbitrairement choisie égale à l, la plus petite des deux dimensions mesurées. Ces calculs fournissent donc des valeurs, sans doute approximatives, mais comparables entre elles, ce qui est leur principal intérêt.

Résultats

Le développement embryonnaire s'effectue en deux étapes principales; l'étape proembryonnaire se caractérise par une segmentation et une répartition progressive des potentialités dans les différents blastomères du globule embryonnaire; l'étape embryonnaire, *sensu stricto*, correspond à la mise en place, grâce à une activité méristématique localisée, des organes embryonnaires (axe radriculaire et cotylédons).

La proembryogenèse

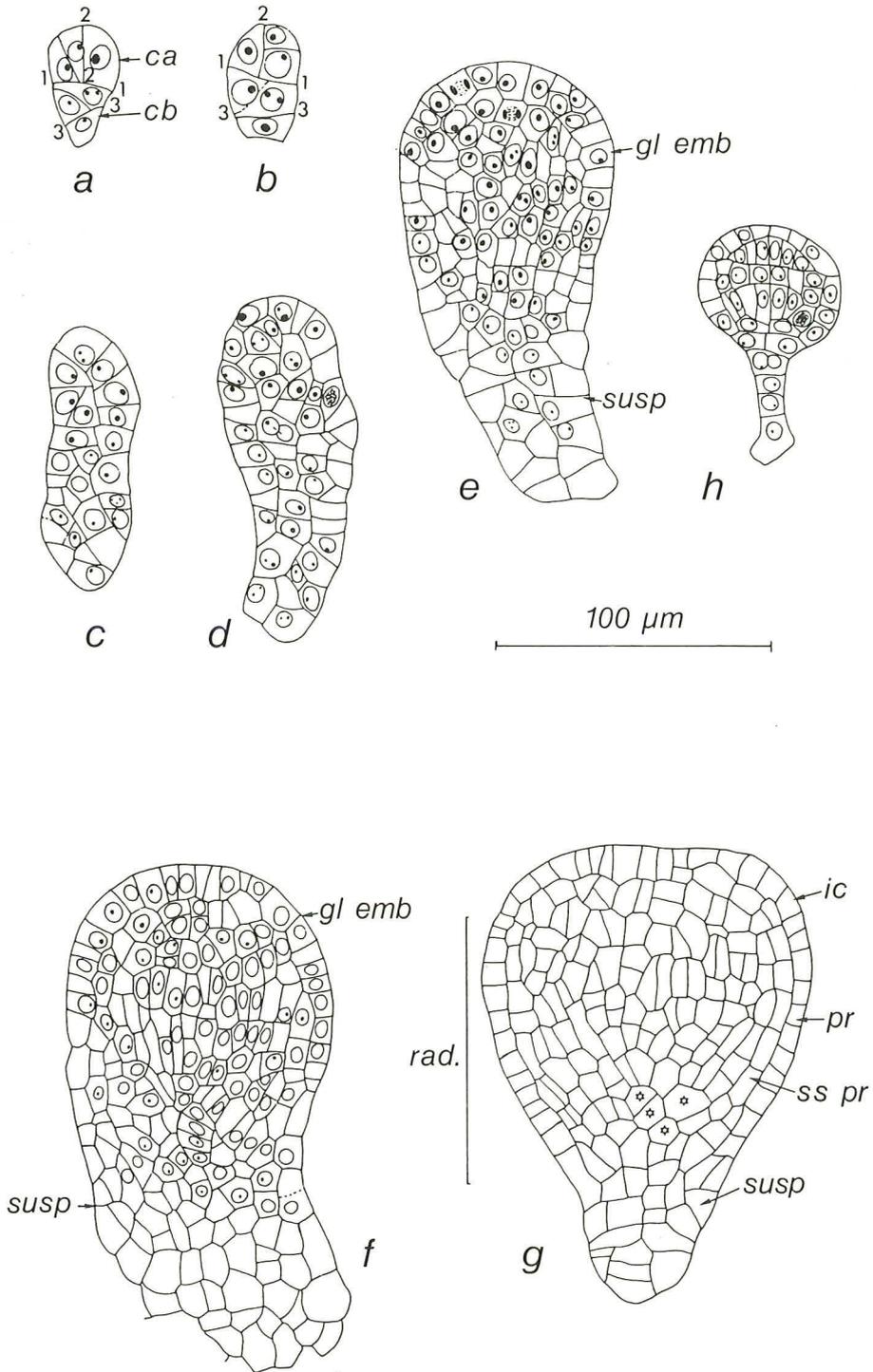
Au moment de la fécondation, l'ovule oblong (550 \times 220 μm) est pourvu de deux téguments relativement minces, qui entourent un nucelle abondant. Celui-ci forme, au pôle micropylaire, un prolongement assez marqué qui maintient le sac embryonnaire en position éloignée du micropyle (espèce crassinucellée, Fig. 3 a).

Le zygote se divise transversalement en une cellule apicale (ca) et une cellule basale (cb); dans un second temps, ca se cloisonne le plus souvent longitudinalement tandis que la cloison qui affecte cb est soit transverse, soit oblique (Fig. 1 a, b). Par la suite, il est rapidement impossible d'établir la généalogie précise des plans de division en raison des variations qui se produisent d'un individu à l'autre; la segmentation devient irrégulière. La comparaison de plusieurs images de proembryons laisse toutefois à penser que la plupart des descendants de cb s'engage dans la constitution d'un suspenseur massif, tandis que l'essentiel de la formation du globule proembryonnaire est assuré par les blastomères issus de ca.

Le caractère massif du suspenseur résulte d'une activité mitotique relativement élevée pendant la première moitié de la proembryogenèse. Cette caractéristique conduit parfois à la réalisation d'embryons sub-cylindriques (Fig. 1 c, 3 c); néanmoins, il s'établit progressivement un gradient cytologique selon l'axe micropyle-chalaze, les cellules des deux pôles acquérant des aspects de plus en plus nettement différents (Fig. 1 e, f et 3 c, d): cellules petites à cytoplasme dense et nucléoles volumineux au pôle

Fig. 1: a—g) Proembryogenèse de la vigne. h) Proembryon de *Petunia*. En (g) les astérisques indiquent la position du centre quiescent originel. — ca: cellule apicale; cb: cellule basale; gl emb: globule embryonnaire; ic: initium cotylédonaire; pr: protoderme; rad: partie radriculaire; ss pr: couche sous-protodermique; susp: suspenseur.

a—g) Proembryogenesis of the grapevine. h) Proembryo of *Petunia*. In (g), the asterisks indicate the position of the primordial quiescent centre. — ca: apical cell; cb: basal cell; gl emb: embryonic globe; ic: initiation of cotyledon; pr: protoderm; rad: radicular zone; ss pr: subprotodermal layer; susp: suspensor.



Evaluations morphométriques de l'embryogenèse de *Vitis vinifera*
 Morphometric evaluation of the embryogenesis of *Vitis vinifera*

Stades	Dimensions cellulaires moyennes (μm)		Volume cellulaire moyen (μm^3)	Volume globule proemb. (μm^3)	Nombre de cellules estimé
	L	l			
A : 4 Cellules (ca)	21	10,5	2 300	9 200	4
B : Globule emb. (45 \times 65 μm)	13,9	8,6	1 000	70 000	70
C : Globule emb. (75 \times 100 μm)	12	7,7	710	295 000	415
D : Globule emb. (90 \times 120 μm)	12,9	6,4	530	510 000	960
E : Embryon mature:					
– Futur méristème caulinaire (45 \times 50 μm)	9,7	6	350	100 000	290
– Hypocotyle	15	12,2	2 230		
– Cortex radicul.	12,9	5,8	440		

apical (chalazial), grandes cellules vacuolisées et à nucléoles de petite dimension au pôle basal (micropylaire).

Nous avons tenté de quantifier ces caractéristiques cytologiques en évaluant les dimensions cellulaires pour quatre stades de croissance proembryonnaire, depuis le proembryon constitué de quelques cellules (Fig. 1 a) jusqu'au proembryon globulaire proche de l'initiation cotylédonnaire (Fig. 1 g). Les dimensions cellulaires ont été mesurées sur des coupes longitudinales axiales. Les résultats, rassemblés dans le tableau, montrent une diminution constante de la plus petite dimension cellulaire (l) qui passe de 10,5 μm à 6,4 μm . Par contre, si l'on assiste à une diminution sensible de la plus grande dimension (L) qui passe de 21 μm à 12,9 μm , on remarque, en fin de proembryogenèse (stade D, Tableau), un allongement caractéristique des cellules basales du globule qui s'effectue préférentiellement selon une orientation subaxiale (Fig. 1 f, g). Ces cellules, de forme et de disposition particulières, correspondent aux premiers éléments de files cellulaires plus ou moins convergentes qui se mettent en place au stade ultime de la phase proembryonnaire (Fig 1 f et g).

L'évaluation du volume cellulaire moyen montre une diminution progressive et importante de ce paramètre au cours de la croissance proembryonnaire. Ces données, rapportées aux volumes des globules embryonnaires correspondants, permettent de déterminer les nombres approximatifs de cellules constituant les jeunes proembryons (Tableau).

L'organogenèse embryonnaire

Lorsque l'embryon atteint 120—130 μm de diamètre dans sa partie apicale (soit environ 1500—1800 cellules), il y a passage, avec l'initiation des cotylédons, d'une symétrie axiale d'ordre un à une symétrie d'ordre deux.

La localisation précise de l'initiation cotylédonaire est difficile; toutefois, les images de jeunes primordiums (Fig. 2 a, b) montrent une simple déformation des deux couches superficielles: la poussée anticline responsable de cette déformation se situe donc plus profondément et vraisemblablement au niveau de la troisième couche cellulaire. La croissance des cotylédons s'effectue ensuite de façon diffuse, pour atteindre la taille définitive d'environ 650 μm de longueur dans l'embryon mature. La nervation de ces organes est alors bien développée et constituée par des faisceaux procambiaux plusieurs fois ramifiés.

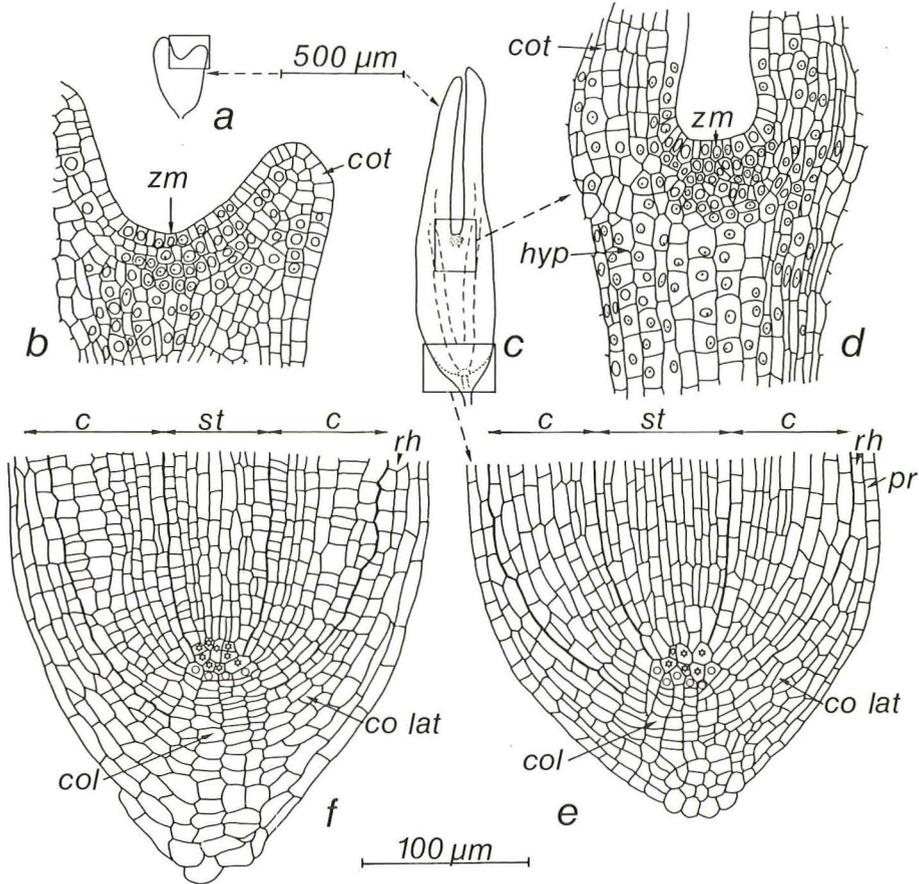


Fig. 2: a) Embryon cordiforme. b) Détail de la partie apicale de (a). c) Embryon à maturité. d et e) Détails des parties apicale et basale de l'embryon (c). f) Extrémité de racine adventive. Les astérisques indiquent la position du centre quiescent originel, les cercles correspondent aux cellules columellaires proximales (cf. texte). — c: cortex; co lat: coiffe latérale; col: columelle; cot: cotylédon; hyp: hypocotyle; pr: protoderme; rh: rhizoderme; st: stèle; zm: zone méristématique du futur apex caulinaire.

a) Cordiform embryo. b) Detail of the apical part of (a). c) Mature embryo. d and e) Details of apical and basal parts of the embryo (c). f) Apex of adventitious root. The asterisks indicate the position of the primordial quiescent centre, the circles correspond to the proximal columellar cells (cf. text). — c: cortex; co lat: lateral rootcap; col: columella; cot: cotyledon; hyp: hypocotyl; pr: protoderm; rh: rhizodermis; st: central cylinder; zm: meristematic zone of the future shoot apex.

La zone intercotylédonaire, futur méristème caulinaire, correspond à un petit territoire assez bien délimité de 45 μm de largeur pour une épaisseur d'environ 50 μm (Fig. 2 c et d) formé de cellules qui ont poursuivi leur processus de dédifférenciation jusqu'à atteindre l'état euméristématique. La petite taille des cellules (9,7 \times 6 μm) contraste avec la grande dimension des cellules hypocotylaires sous-jacentes (Tableau, Fig. 2 d). Le volume cellulaire moyen (350 μm^3) permet d'estimer que, pour un embryon arrivé à maturité, le nombre de cellules de ce futur point végétatif est compris entre 250 et 300.

Au pôle basal, le méristème radicaire commence à se mettre en place dès la fin de l'étape proembryonnaire. Les premiers faits repérables de cette organogenèse sont les suivants: 1° — convergence d'éléments de files cellulaires vers quelques cellules isodiamétriques centrales, 2° — dédoublement de la couche sous-protodermique dans la zone basale du globule embryonnaire (Fig. 1 g). L'observation d'embryons bien développés permet ensuite d'analyser l'organisation du méristème radicaire définitivement constitué dans lequel on retrouve les zones habituellement décrites: les cellules isodiamétriques représentent l'ébauche d'un centre quiescent vers lequel convergent les files cellulaires du cylindre central et du cortex; sous le centre quiescent, quelques files de cellules verticales plus ou moins régulières correspondent à l'amorce d'une columelle tandis que les parties latérales adjacentes à cette columelle constituent la partie latérale de la coiffe d'origine sous-protodermique (Fig. 1 g, 2 e).

Discussion

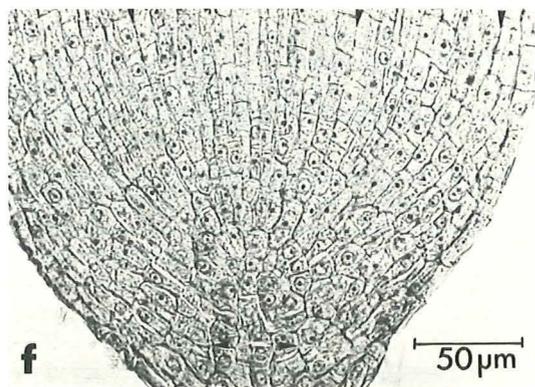
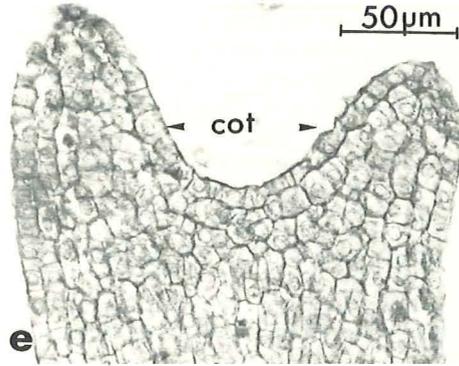
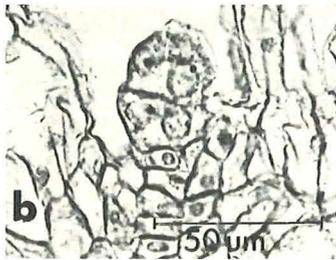
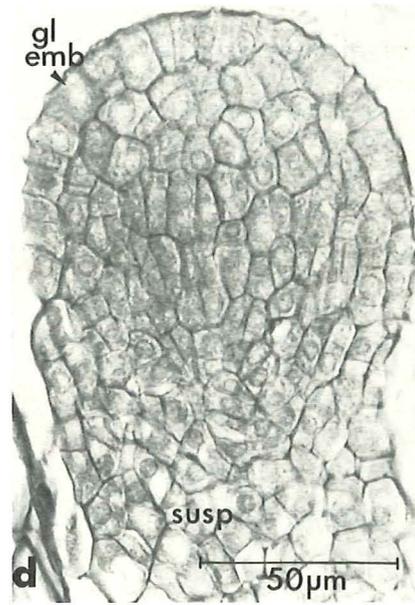
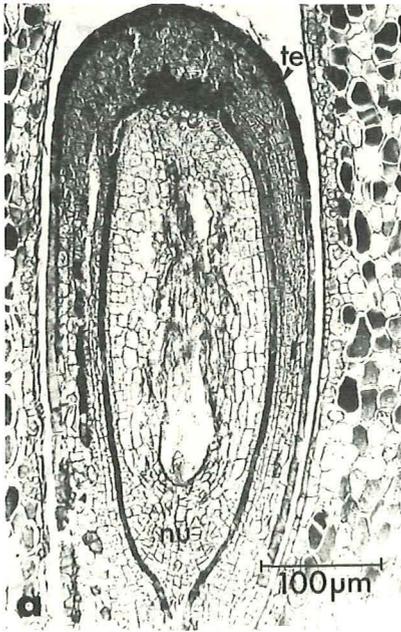
Le développement de l'embryon de vigne s'effectue selon un axe micropyle-chalaze préétabli dans le sac embryonnaire. Cet axe de polarité se matérialise rapidement par un gradient de l'état de dédifférenciation cytologique: au pôle micropylaire, il se met en place un suspenseur massif, dépourvu de protoderme et formé de cellules qui demeurent volumineuses et vacuolisées. Par contre, au pôle chalazial, il s'individualise un protoderme plus ou moins régulier qui entoure une masse de cellules à dédifférenciation progressive.

Le cloisonnement longitudinal de la cellule apicale (ca) du proembryon bicellulaire permet de situer l'embryogénie de *Vitis* dans la série A de la classification de SOUEGES (1939) ou de la rapprocher des types «Asterad» et «Onagrad» de JOHANSEN (1950). Cependant, des variations nombreuses dans l'orientation des plans de segmentation se produisent de façon précoce, dès la troisième génération cellulaire. Ces observations, qui confirment celles effectuées sur *Vitis pallida* (NAIR et PARASURAMAN 1962), ne permettent pas de rattacher le genre *Vitis* à un type plus précis d'embryogénie; il s'agit d'un modèle principalement caractérisé par un développement embryonnaire irrégulier conforme à ce qui a déjà été décrit chez plusieurs genres parmi les familles d'Angiospermes (VALLADE 1976).

Cette segmentation irrégulière conduit à la formation d'un globule proembryonnaire volumineux qui mesure 120 μm de diamètre et compte environ 1500 cellules juste

Fig. 3: a) Coupe sagittale d'un ovule. b) Jeune proembryon. c) Proembryon cylindrique. d) Proembryon globulaire. e) Partie apicale d'un embryon cordiforme. f) Apex radicaire. — cot: cotylédon; gl emb: globule embryonnaire; nu: nucelle; susp: suspenseur; te: téguments.

a) Sagittal section of ovule. b) Young proembryo. c) Subcylindrical proembryo. d) Globular proembryo. e) Apical part of a cordiform embryo. f) Radicular apex. — cot: cotyledon; gl emb: embryonic globule; nu: nucellus; susp: suspensor; te: integuments.



avant l'initiation des cotylédons. La comparaison avec un modèle régulier du type *Petunia* (Fig. 1 h) permet de constater que le proembryon de vigne présente un diamètre 2 fois supérieur, un volume 8 fois plus grand et un nombre de cellules 3—4 fois plus important. Ces corrélations apparentes entre caractère irrégulier et masse proembryonnaire relativement volumineuse d'une part et caractère régulier et volume globulaire réduit d'autre part, paraissent très générales et nous ont amené antérieurement (VALLADE 1976) à définir deux catégories de proembryogenèse: l'une dilatée, mal coordonnée, montre une dédifférenciation lente dans un proembryon volumineux; c'est le modèle *p a c h y e m b r y é* (= euembryé) auquel appartient la vigne; l'autre contractée, bien coordonnée, présente une dédifférenciation rapide dans un proembryon réduit; c'est le modèle *l e p t e m b r y é* auquel appartient le pétunia.

Au-delà de cette première phase de segmentation, l'organogenèse embryonnaire débute par l'individualisation de deux foyers méristématiques opposés à l'origine des cotylédons dont la croissance est ensuite assurée par une activité mitotique apparemment diffuse. En position intercotylédonaire, le territoire à vocation caulinaire poursuit sa dédifférenciation cytologique; il ne terminera son organisation et ne deviendra fonctionnel qu'après la germination.

Par contre, au pôle basal de l'embryon, le méristème radicaire s'organise rapidement et fonctionne dès le stade embryonnaire; il est à l'origine de la majeure partie de l'axe hypocotylédonaire. L'examen d'une radicule d'un embryon déjà bien développé (Fig. 2 e, 3 f) montre l'existence des différents territoires habituellement rencontrés; le centre quiescent originel se reconnaît à la forme isodiamétrique de ses cellules. L'absence de continuité histologique avec les files cellulaires contiguës exclut la possibilité de considérer ces cellules comme des initiales. Par contre, les cellules du cylindre central et du cortex à proximité de ce centre quiescent constituent des *z o n e s e u a c t i v e s* à l'origine de la croissance basipète du corps de la jeune radicule. Une seconde zone euactive se situe à l'opposé du centre quiescent où 4—5 cellules proximales (sur une coupe longitudinale axiale, Fig. 2 e) assurent la croissance basifuge d'autant de files cellulaires verticales constituant la columelle. Latéralement, la partie de la coiffe au contact des deux zones euactives précitées, ne paraît pas présenter de programme morphogénétique autonome; c'est une région dont la croissance est induite à la fois par le cortex et la columelle selon deux directions suborthogonales; de ce point de vue, la partie latérale de la coiffe peut être considérée comme une *z o n e a c t i v e p a r s o l l i c i t a t i o n* (VALLADE *et al.* 1978, 1983). A côté de ce type d'organisation reconnu chez la majorité des Dicotylédones, deux particularités doivent être soulignées: 1° — Le protoderme ne participe en rien à l'épaississement de la partie latérale de la coiffe dont l'origine se situe au niveau sous-protodermique contrairement au cas habituel des espèces leptembryées mais aussi de certaines espèces pachyembryées (*Datura* par exemple, VALLADE 1976). A strictement parler, la radicule embryonnaire présente donc une origine endogène. Ce caractère, qui se trouve encore plus accentué chez les Graminées (IBANNAIN 1986), est vraisemblablement à mettre en relation avec la nature massive du suspenseur. 2° — Les files les plus externes du cortex ne convergent pas vers le centre quiescent originel, mais vers des cellules qui topographiquement appartiennent à la columelle (Fig. 2 e). Deux éventualités peuvent alors se présenter: soit ces cellules columellaires proximales deviennent mitotiquement peu actives à inactives et dans ce cas elles s'intègrent au centre quiescent; soit ces cellules se recloisonnent pour contribuer à la croissance de la columelle; dans ce dernier cas, ce sont les files cellulaires externes du cortex qui participent alors à l'épaississement des parties latérales de la coiffe. L'observation d'une coupe longitudinale axiale d'une racine adventive (Fig. 2 f) montre une organisation de l'extrémité racinaire remarquablement semblable à celle de la radicule embryonnaire. Sur l'échantillon représenté

(Fig. 2 f), la seconde éventualité indiquée ci-dessus paraît réalisée et la participation du cortex externe à la formation de la coiffe est visible (partie gauche du schéma). De ce fait, le méristème racinaire de *Vitis* correspond donc au type «ouvert» et présente les mêmes caractéristiques que celui décrit par exemple chez le pois (JONES 1977; CLOWES 1978). On notera que ce modèle d'organisation est mis en place d'emblée au niveau embryonnaire sans jamais passer par le type «fermé» comme c'est le cas chez *Helianthus* (VON GUTTENBERG 1968; VALLADE *et al.* 1983) et d'autres Composées (ARMSTRONG et HEIMSCH 1976).

Résumé

Le développement embryonnaire de *Vitis vinifera* L. est étudié depuis le zygote jusqu'au stade de l'embryon définitif prélevé dans la graine mûre. Les plans de segmentation sont précocement irréguliers et conduisent à la formation d'un globule proembryonnaire volumineux, constitué d'environ 1500 cellules dédifférenciées surmontant un suspenseur massif. L'organogenèse embryonnaire débute par l'initiation des cotylédons et la mise en place du méristème radicaire. Le territoire intercotylédonnaire à vocation caulinaire, constitué d'environ 300 cellules, poursuit sa dédifférenciation cytologique mais ne terminera son organisation et ne deviendra actif qu'au delà de la germination. Par contre, le méristème radicaire se structure et entre en fonctionnement dès l'étape embryonnaire. Son organisation (type «ouvert») est identique à celle d'une racine adventive prise comme élément de comparaison.

Bibliographie

- ARMSTRONG, J. E.; HEIMSCH, C.; 1976: Ontogenic reorganization of the root meristem in the Compositae. *Amer. J. Bot.* **34**, 204—211.
- BERNARD, A.-C.; 1980: Contribution à l'étude de la biologie et des méristèmes des Vitacées. Thèse, Montpellier.
- BESSIS, R.; 1986: Grapevine physiology: The contribution of culture *in vitro*. *Experientia* **42**, 927—933.
- CARRARO, L.; LOMBARDO, G.; CARGNELLO, G.; GEROLA, F. M.; 1979: Studies on the embryo sac and on the stigmatic receptivity of *Vitis* cultivars with different productivity (Picolit giallo and Verduzzo friulano). *Vitis* **18**, 285—290.
- — —; — — —; — — —; 1981: Further observations on the factors related to the low productivity of Picolit giallo. *Vitis* **20**, 193—201.
- CLOWES, F. A. L.; 1978: Origin of quiescence at the root pole of pea embryos. *Ann. Bot.* **42**, 1237—1239.
- GUTTENBERG, H. VON; 1968: Der primäre Bau der Angiospermenwurzel. *Handbuch der Pflanzenanatomie*, **VIII**, Tl. 5. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- IBANNAIN, Z.; 1986: Recherches sur les modalités essentielles de l'embryogenèse chez les Embryophytes. Application à l'interprétation de l'embryon des Monocotylédones. Thèse 3ème Cycle, Dijon.
- JOHANSEN, D. A.; 1950: Plant embryology. Embryogeny of the Spermatophytes. *Chronica Botanica Company*. Waltham, Mass.
- JONES, P. A.; 1977: Development of the quiescent center in maturing embryonic radicles of pea (*Pisum sativum* L., cv. Alaska). *Planta* **135**, 233—240.
- KASSEMAYER, H.-H.; STAUDT, G.; 1981: Über die Entwicklung des Embryosacks und die Befruchtung der Reben. *Vitis* **20**, 202—210.
- — —; — — —; 1982: Cytologische Untersuchungen über die Ursachen des Verrieselns bei *Vitis*. *Vitis* **21**, 121—135.
- — —; — — —; 1983: Über das Wachstum von Endosperm, Embryo und Samenanlagen von *Vitis vinifera*. *Vitis* **22**, 109—119.

- KRUL, W. R.; WORLEY, J. F.; 1977: Formation of adventitious embryos in callus cultures of 'Seyval', a French hybrid grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **102**, 360—363.
- ME, G.; SACERDOTE, S.; VALLANIA, R.; 1984: Osservazioni sulla meiosi in cellule madri del polline di *Vitis vinifera* L. (cv. Barbera) diploide e tetraploide. *Vitis* **23**, 195—201.
- MULLINS, M. G.; SRINIVASAN, C.; 1976: Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of grapevine (cv. Cabernet Sauvignon) by apomixis *in vitro*. *J. Exper. Bot.* **27**, 1022—1030.
- NAIR, N. C.; PARASURAMAN, V.; 1962: Embryological studies of *Vitis pallida* W. et A. *Phyton* **18**, 157—164.
- NEGI, S. S.; RANDHAWA, G. S.; 1971: A contribution to the embryology of *Vitis vinifera* L. *Ind. J. Hort.* **22**, 176—182.
- SHARMAN, B. C.; 1943: Tannic acid and iron alun with safranin and orange G in studies of the shoot apex. *Stain Technol.* **18**, 105—111.
- SOUEGES, R.; 1939: Exposés d'Embryologie et de Morphologie Végétales. X. Embryogénie et Classification: Essai d'un Système Embryogénique. Hermann et Cie. Edit., Paris.
- VALLADE, J.; 1976: Contribution à la connaissance des problèmes fondamentaux de l'embryogenèse chez les Angiospermes. Recherches sur le *Petunia hybrida* HORT. et quelques autres espèces. Thèse, Dijon.
- — ; ALABOUVETTE, J.; BUGNON, F.; 1978: Apport de l'ontogenèse à l'interprétation structurale et fonctionnelle du méristème racinaire du *Petunia hybrida*. *Rev. Cytol. Biol. Vég., Bot.* **1**, 23—47.
- — ; BUGNON, F.; GAMBADE, G.; ALABOUVETTE, J.; 1983: L'activité edificatrice du proméristème racinaire: Essai d'interprétation morphogénétique. *Bull. Sci. Bourg.* **36**, 57—76.

Eingegangen am 5. 1. 1987

J. VALLADE
 J. ALABOUVETTE
 A.-M. CHABBERT
 Laboratoire de Botanique et
 Ecologie Végétale
 Université de Bourgogne
 Bâtiment „Mirande“
 B. P. 138
 21004 Dijon Cedex
 France