

Une nouvelle méthode d'isolement de la nervation des feuilles d'arbres (*)

PAR J. A. MOUTON

*Laboratoire de Phanérogamie, Muséum national d'Histoire naturelle,
16 rue Buffon, Paris 5^e.*

Résumé. — Description d'une méthode originale pour isoler les nervations des feuilles des plantes ligneuses tropicales. Sont nécessaires : un autoclave, une solution de potasse à 5 ou 10 % ou une solution d'oxalate d'ammonium à 20 g/l. Les nervures dégagées sont colorées au violet Orasol 3 B et peuvent être reproduites grandeur nature par un procédé photographique contact sur négatif « Kodalith ». Les détails d'application sont mentionnés dans le texte.

Summary. — This wet method is particularly suitable for isolate nervations of leaves with papery or parchment-like texture. — 1. Put leaves in KOH mixture according to texture of lamina and set in autoclave (firm : KOH 5 %, 1 h, 1 kg ; coriaceous : 10 %, 1 h, 2 kg). — 2. Brush slowly the lamina under water with a shaving-brush on the lower and upper surfaces and sweep away mesophyll and epidermis. Take off the epidermis is possible with grips. — 3-4. Bleach nervation with water — diluted « eau de Javel » (50 %) and wash with acetic acid — water (1 %) during 5 min. — 5. Color with deep colouring : violet orasol 3B mixture 1 % (CIBA, Saint-Fons, Fr.) in ethylic alcohol-xylene (1 p. 1 p.) during 5 min. — 6. Dry on nylon-cloth for avoid sticking. — 7. Contact technique is used for photograph : « Kodalith » negativ-film and « Kodaline » photographic paper are necessary. Helping-hands are cited in text.

*

**

La méthode d'éclaircissage à la potasse (FOSTER 1952, 1953, 1955) suivie de coloration à la safranine a permis de mettre en évidence la valeur taxonomique de la nervation. Il y eut de nombreuses applications de cette technique, entre autres LEMS 1963 et GAUDET 1964, et des variantes d'emploi de la méthode, notamment au Brésil : HANDRO 1964, 1967, 1970, FIGUEIREDO 1971. La méthode est idéale pour les feuilles jeunes de texture herbacée. Pour les textures papyracée, parcheminée ou coriace, un épiderme épais et parfois la présence de sclérites conservent un fond de teint dû au colorant ; c'est pourquoi on ne peut avoir une reproduction photographique parfaite, en grandeur nature, de la nervation dans son ensemble. En effet, les détails de la nervation et le fond de teint empâtent très rapidement le cliché. C'est pourquoi nous avons mis au point une méthode éliminant toutes les parties du limbe (parenchyme, tissu palissadique, sclérites, épidermes) hormis la nervation par actions chimique et mécanique.

* Séance du 1^{er} décembre 1972.

MATÉRIELS ET PRODUITS NÉCESSAIRES

Matériel.

Feuilles fraîches ou séchées, indifféremment.
 Un bécber de un ou deux litres et un couvercle.
 Un autoclave fonctionnant sous un ou deux kilogs de pression.
 Une cuvette à fond plat.
 Un blaireau.
 Une pince à bout rond.
 Une toile moustiquaire en nylon (Textiglass).

Produits.

Potasse commerciale en granulés,
 ou Oxalate d'ammonium cristallisé.
 Eau de Javel.
 Acide acétique commercial.
 Colorant recommandé : « Violet Orasol 3 B » (CIBA, Saint-Fons, Rhône).

MODE OPÉRATOIRE

1°. Mettre les feuilles fraîches ou sèches dans un bécber de 1 ou 2 litres rempli d'une solution aqueuse de potasse à 5 ou 10 % selon la texture du limbe : 5 % pour texture herbacée ou papyracée ; 10 % pour limbe parcheminé ou coriace.

2°. Passer à l'autoclave durant 1 heure à la pression de 2 kilogs sauf exception : pour les limbes herbacés (30 minutes à 1 kg) ou coriaces (2 h à 2 kg). Le bécber est recouvert d'une vitre pour éviter toute projection.

3°. Laisser tomber la pression lentement avant de sortir le bécber de l'autoclave pour éviter une ébullition qui détruirait la texture du limbe.

4°. Vider le bécber dans une cuvette à fond plat. Remplacer la solution potassique par de l'eau. Mettre le limbe la face inférieure en-dessus, puis décanter de façon à ne conserver qu'une faible pellicule d'eau.

5°. Brosser le limbe doucement et lentement avec un blaireau. Les particules du limbe se dispersent dans l'eau. En cas d'adhérence du limbe au réseau nerveaire, piquer avec le blaireau puis broser. Retourner ensuite la nervation la face supérieure en-dessus et recommencer à broser pour ôter l'épiderme supérieur. La totalité du limbe et de l'épiderme doit avoir disparu après ces frottements, sinon la solution potassique n'est pas assez concentrée pour la texture ou bien le temps passé en autoclave est trop court. On peut également, avant

brossage, retirer l'épiderme avec une pince et la monter entre lame et lamelle, mais il faut prendre soin d'en noter l'orientation.

6°. Eliminer toutes les particules solides par un courant d'eau léger. La nervation est alors entièrement mise à nu mais très fragile et toujours dans l'eau. La durée du nettoyage varie d'une minute (*Diospyros abyssinica*, *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal) à 10 minutes.

7°. Blanchir à l'eau de Javel diluée de moitié durant 15 minutes. Eliminer l'eau de Javel par un bain d'eau acétique (ac.acétique 1 %) suivi d'un rinçage. Cela facilite la coloration ultérieure et le séchage également. Un mauvais lavage entraîne une mauvaise coloration.

Remarques : Si la nervation obtenue en 7° est très fragile, il faut la sécher avant de passer au stade 8. La manipulation de la nervation en voie humide se fait en glissant sous elle une toile grillagée ou une vitre.

8°. Pour améliorer la visibilité de la nervation, il faut la colorer. La spécificité n'est pas exigée et tous les colorants se sont montrés très bons (dont la safranine). Toutefois, nous avons retenu le « Violet Orasol 3 B » (solubilité 20 g/l dans alcool chaud), fourni gracieusement pour essai par la firme CIBA (usine de Saint-Fons, Rhône) que nous remercions vivement, à cause de sa stabilité à la lumière et à l'eau de Javel, de sa couleur presque noire donnant une bonne reproduction photographique. Employer le colorant à 1 % dans une solution d'alcool éthylique-xylène (1p.-1 p.). Laisser 10 minutes dans le colorant.

9°. Retirer la nervation du bain liquide à l'aide d'une pince et la faire reposer, pour séchage, sur une toile moustiquaire en nylon (Textiglass). La nervation n'adhère pas à ce support alors qu'elle le fait sur tout autre : papier, toile, verre.

CHOIX DE LA CONCENTRATION EN POTASSE ET VARIANTES DU PROCÉDÉ

C'est là une des difficultés de la méthode. Le choix dépend de la texture du limbe et peut se résumer en variantes dénommées K 1, K 5, K 10, K 15 se résumant ainsi :

	Texture du limbe	KOH %	Durée	Autoclave pression
K 1	herbacée, papyracée	1 %	1/2 h - 1 h	1 kg
K 5	papyracée	5 %	1 h	1 kg
K 10	parcheminée	10 %	1 h	2 kg
K 15	coriace	15 %	2 h	2 kg

— K 1 est peu employé car cette texture est rare sous les tropiques ;

Exemples :

<i>Discoglyprena caloneura</i> (Pax) Prain	Euphorbiacée
<i>Erythroxyllum emarginatum</i> Schum. et Thonn.	Erythroxyllacée
<i>Macaranga hurifolia</i> Beille	Euphorbiacée
<i>Oncinotis batesii</i> Stapf	Apocynacée

On peut également utiliser la solution d'oxalate d'ammonium cristallisé (20 g/l) pour K 1 et K 5. Son action est moins violente et moins rapide que la potasse mais peut donner de meilleurs résultats.

— K 5 : Concentration la plus souvent utilisée et valable pour de nombreux ordres et familles : Malvales, Myrtales, Rutales, Urticales, Clusiacées, Euphorbiacées, Moracées.

Nous avons eu d'excellents résultats avec les espèces suivantes :

<i>Celtis australis</i> L.	Ulmacée
<i>Crudia senegalensis</i> Planch. ex Benth.	Légumineuse
<i>Diospyros abyssinica</i> (Hiern.) White	Ebénacée
<i>Drypetes ivorensis</i> Hutch. et Dalz.	Euphorbiacée
<i>Ficus lepriouri</i> Miq.	Moracée
<i>Isolona campanulata</i> Engl. et Diels	Annonacée
<i>Populus tremula</i> L.	Salicacée
<i>Rhaphiostylis preussii</i> Engl.	Icacinacée
<i>Strychnos aculeata</i> Solered.	Loganiacée
<i>Symphonia globulifera</i> L.	Clusiacée

— K 10 : Moins utilisé que K.5 mais cependant courant sous les tropiques :

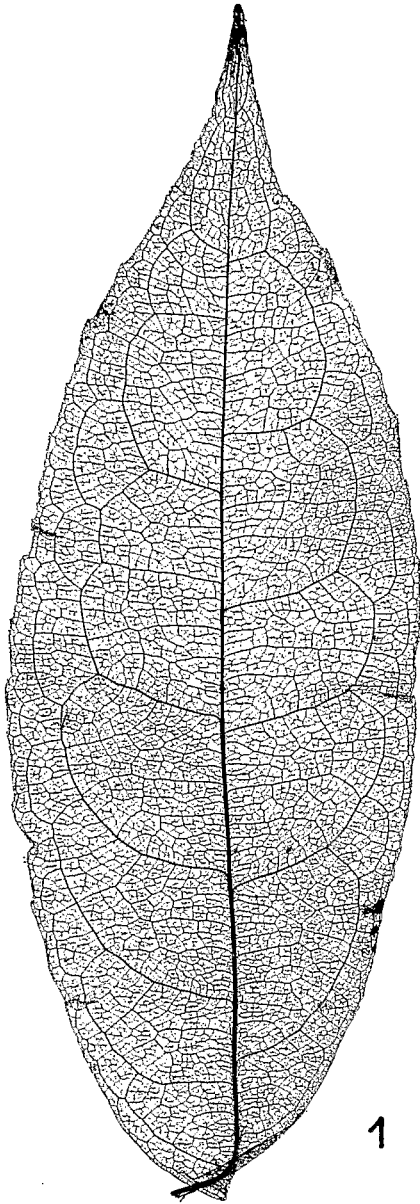
<i>Artocarpus integrifolia</i> L.	Moracée
<i>Blighia sapida</i> König	Sapindacée
<i>Citrus bigaradia</i> Loisel.	Rutacée
<i>Ouratea glaberrima</i> (P. Beauv.) Engl. ex Gilg.	Ochnacée
<i>Pachyra insignis</i> (Sw.) Savign.	Bombacacée
<i>Xylophia villosa</i> Chipp	Annonacée

— K 15 : Employé exceptionnellement car il y a très peu de feuilles très coriaces. Nous atteignons ici la limite d'utilisation de la méthode. Valable pour :

Triphyophyllum peltatum (Hutch. et Dalz.) A. Shaw Dioncophyllacée.

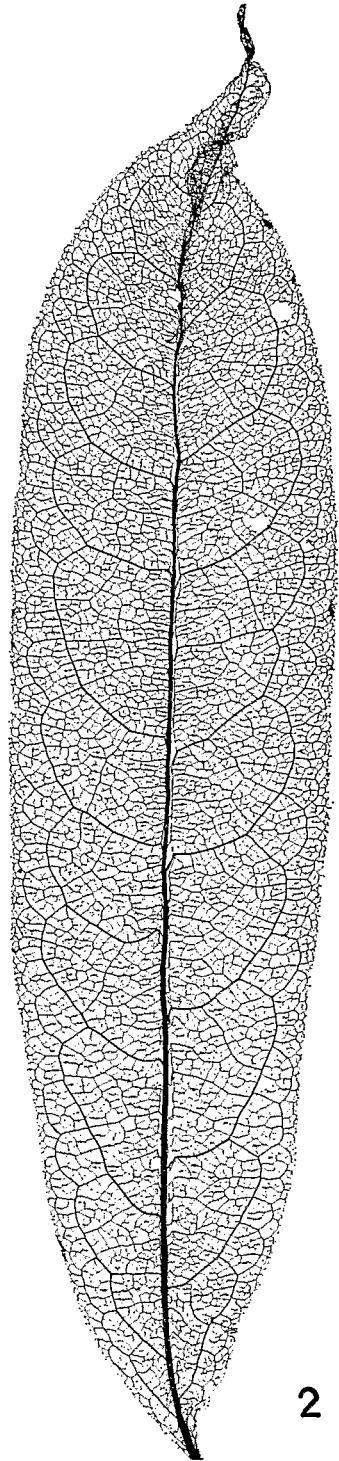
PLANCHE 1. (× 1).

- 1 : *Drypetes ivorensis* Hutch. et Dalz., Euphorbiacée.
2 : *Isolona campanulata* Engl. et Diels, Annonacée.

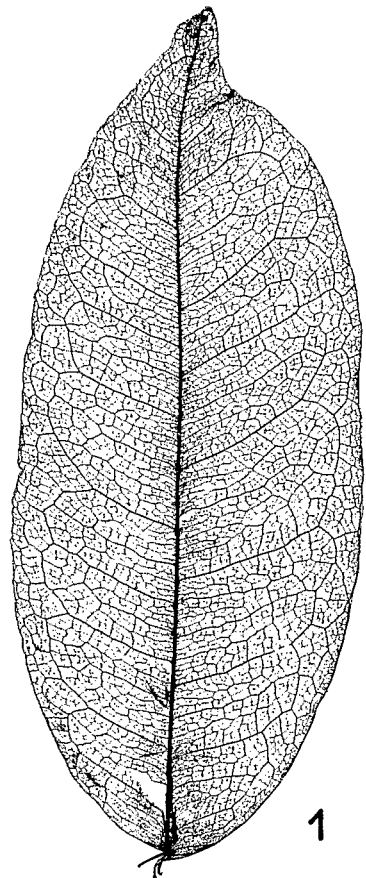


1

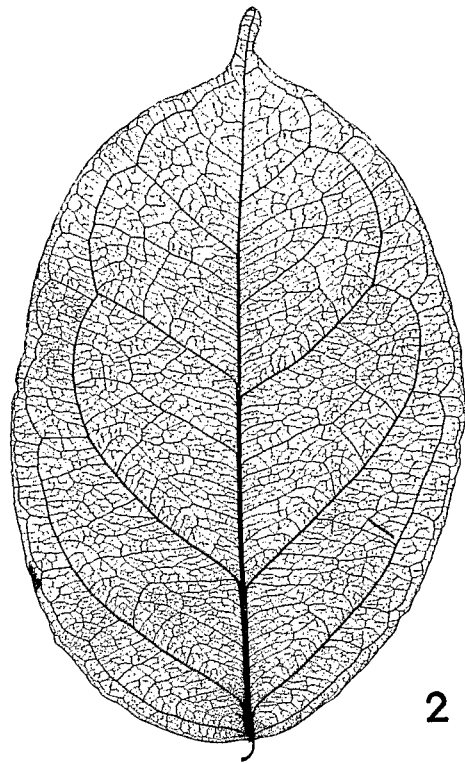
PLANCHE 1



2

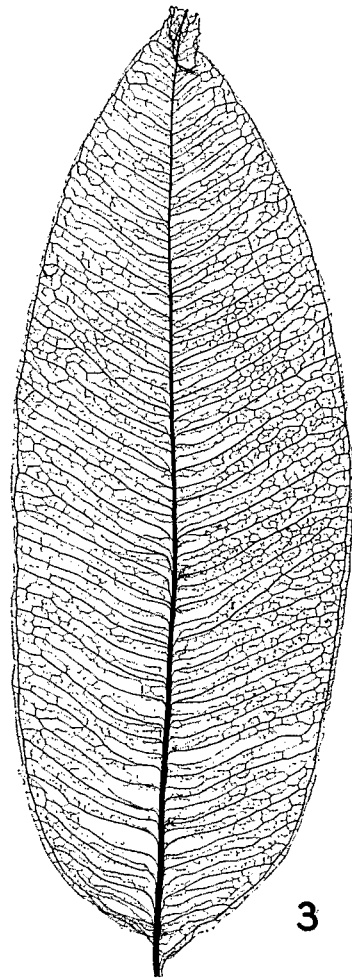


1



2

PLANCHE 2



3

REPRODUCTION PHOTOGRAPHIQUE

La reproduction des nervations peut se faire par deux procédés photographiques :

- papier inversible Kodak 43,
- tirage sur papier par contact.

Papier inversible.

Nous avons disposé le papier inversible derrière la nervation isolée dans un cadre contre un mur. Une lampe ordinaire de 100 w disposée à 2 mètres et un temps d'exposition très strict (90 sec.). A 60 sec. le papier était sous-exposé et à 120 sec. sur-exposé. L'emploi d'un filtre jaune améliore nettement le « fini » de la nervation ultime et augmente la marge d'exposition.

Tirage — papier.

Deux problèmes sont à résoudre : d'abord le « flou » dû à l'ombre portée des nervures sur le négatif dans le cas d'un procédé contact, ensuite l'« empâtement » lors du tirage sur papier.

Nous avons résolu le premier de la manière suivante. Sous un agrandisseur ouvert au maximum et 2 lampes flood placées à 45°, nous avons empilé successivement : du papier filtre (ou buvard) formant une couche souple, le négatif (« Kodalith », super ortho normal), la nervation isolée (face inférieure en dessus) et un verre épais par dessus. Ainsi nervures primaires plus épaisses et nervures ou nervilles plus petites sont appliquées contre la surface sensible en évitant toute ombre portée. Le temps d'exposition était de 6 secondes pour un éclairage de 500 watts. Pour le tirage papier, les lampes flood étaient supprimées et l'éclairage de l'agrandisseur seul maintenu. Le négatif Kodalith remplaçait la nervation et le papier photographique contraste (Kodaline) posé sur les buvards. Le temps d'exposition était lui aussi très strict pour éviter l'empâtement du papier. Ce temps varie avec la densité de la nervation : ce peut être un procédé valable pour estimer rapidement la densité. Ce second procédé nous a donné toute satisfaction. Nous donnons deux planches de reproduction.

CONSERVATION

Les nervations obtenues se conservent fort bien à sec et ne sont pas fragiles si elles ne sont pas manipulées très souvent. En cas de

PLANCHE 2. (× 1).

- 1 : *Crudia senegalensis* Planch. ex Benth., Caesalpiniée.
- 2 : *Rhaphiostylis preussii* Engl., Icacinacée.
- 3 : *Symphonia globulifera* Linn., Clusiacée.

manipulation, nous les avons protégées en les plaçant en sandwich entre deux feuilles de plastique encollé et soudé à chaud sous faible pression. Le film plastique encollé (Film Morane mat 50/1000 d'épaisseur) et la presse à plastifier de bureau « type APX » ont été fournis par « Réalisations techniques et plastiques », 35 avenue Simon Bolivar, Paris 19.

CONCLUSION

Ce procédé simple est particulièrement utile pour étudier les nervations des arbres tropicaux. Il résoud également le problème de leur reproduction photographique, sans solution jusqu'ici. Il ne demande qu'un matériel réduit, facilement utilisable même sous les tropiques. Les applications de cette technique sont nombreuses : identification des espèces d'après la morphologie nerveaire (MOUTON 1963), particulièrement utile pour les forestiers, les botanistes tropicaux et les paléobotanistes (MELVILLE 1971, WOLFE 1972). En physiologie, la mensuration de la densité nerveaire en est simplifiée par montage du négatif ou de la nervure en diapositive, un agrandissement est obtenu sur lequel on mesure au curvimètre la longueur totale des nervures au centimètre carré.

BIBLIOGRAPHIE

- FIGUEIREDO (R. de C.), HANDRO (W.), CAVALCANTE (P. B.), 1971. — Contribuição ao estudo da nervação foliar das plantas do cerrado — Connaraceae, Ebenaceae e Guttiferae. *3th Symp. sobre Cerrado* ; Univ. Sao Paulo, Brasil, 231-239.
- FOSTER (A. S.), 1952. — Foliar venation in angiosperms from an ontogenic standpoint. *Amer. J. Bot.*, 39, 752-766.
- FOSTER (A. S.), 1950 (1953). — Techniques for the study of venation patterns on the leaves of angiosperms. *Proc. 7th Bot. Congr. Stockholm*, 586-587.
- FOSTER (A. S.), 1955. — Structure and ontogeny of terminal sclereids in *Boronia serrulata*. *Amer. J. Bot.*, 42, 551-561.
- GAUDET (J. J.), 1964. — Morphology of *Marsilea vestita*, 2. *Amer. J. Bot.*, 51, 591-597.
- HANDRO (W.), 1964, 1967. — Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das amarantaceas dos cerrados. *Anais Acad. Bras. Ci.*, 36, 479-499 ; 37, 495-506.
- HANDRO (W.), MELLO CAMPOS (J. F. B. de) et OLIVEIRA (Z. M. de), 1970. — Sobre a anatomia foliar de algumas Compositas dos campos rupestres. *Ciencia e Cultura*, 22, 107-126.
- HICKEY (L. J.), 1973. — Classification of the architecture of dicotyledonous leaves. *Amer. J. Bot.*, 60, 17-33.
- LEMS (K.), 1963. — Leaf anatomy as a taxonomic tool in the Ericaceae. *Amer. J. Bot.*, 50, 635.
- MELVILLE (R.), 1971. — Some general principles of leaf evolution. *S. Afr. J. Sci.*, 67, 310-316.
- MOUTON (J. A.), 1963. — De la possibilité d'identification des feuilles de phanérogames ligneuses de Côte d'Ivoire. *Mémoire inédit*, 357 pp. dact.

- MOUTON (J. A.), 1970. — Architecture de la nervation foliaire. 92^e Congr. Soc. Sav., Strasbourg 1967 ; Paris 1970, sci., sér. 3, 165-176.
- MORLEY (T.), 1968. — Accelerated clearing of plant leaves by NaOH in association with oxygen. *Stain Techno.*, 43, 315-319.
- WOLFE (J. A.), 1972. — Significance of comparative foliar morphology to paleobotany and neobotany. *Amer. J. Bot.*, 59 (6.2), 664.

14

BULLETIN

DE LA

SOCIÉTÉ BOTANIQUE

DE FRANCE

FONDÉE LE 23 AVRIL 1854 ET RECONNUE COMME ÉTABLISSEMENT
D'UTILITÉ PUBLIQUE PAR DÉCRET DU 17 AOUT 1875

Publication subventionnée par le Centre National de la Recherche Scientifique

COMMISSION DES PUBLICATIONS

MM. AUBREVILLE, AYMONIN, BONNOT, BOUREAU, CAMEFORT, CHADEFAUD,
CHAMPAGNAT, DAVID, DEYSSON, EICHHORN, FELDMANN, GENEVÈS,
GORENFLOT, GUIGNARD, GUINOCHET, HAMEL, HEIM, JACAMON, JAEGER,
KERGUELEN, KÜHNER, DE LEIRIS. M^{me} LETROUIT. M. LOISEAU
M^{lle} LONGEVIALLE, MM. MANGENOT, MARESQUELLE, MESTRE,
OZENDA, PARIS, SAUVAGE, SCHNELL, TROCHAIN,
VAZART, VIDAL, VIENNOT-BOURGIN.

Tome 119 — N° 9

EXTRAIT

PARIS

—
1972

-7 DEC. 1973
D. M. S. S. S. S. S.

Collection de Référence

n° 6516 Bot

Flourens