

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES
SUR
LA SEXUALITÉ DES SPORES
CHEZ
LES MOUSSES DIOÏQUES

PAR

Élie MARCHAL

CONSERVATEUR HONORAIRE DU JARDIN BOTANIQUE DE L'ÉTAT

ET

Émile MARCHAL

PROFESSEUR A L'INSTITUT AGRICOLE DE L'ÉTAT A GEMBOUX

DEVISE :

*Les sciences, sans bornes comme la
nature, s'accroissent à l'infini par
les travaux des générations succes-
sives (LAPLACE, Exp. V, 3).*

Mémoire couronné par la Classe des sciences, dans la séance
du 15 décembre 1905.

Mémoire présenté en réponse à la question suivante :

Il existe un assez grand nombre de végétaux dioïques (divers OEDOGONIUM, les Muscinées dioïques, etc.), chez lesquels un même œuf donne naissance, par suite de division, à plusieurs individus. On demande des recherches expérimentales sur la question de savoir si ces individus sont toujours nécessairement du même sexe. (6^e question du programme de 1905 des concours de l'Académie royale de Belgique.)

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES
SUR
LA SEXUALITÉ DES SPORES
CHEZ
LES MOUSSES DIOÏQUES

INTRODUCTION

Il faut remonter à plus d'un siècle en arrière pour constater l'existence, chez les bryologues, de notions précises et exactes sur la sexualité des Mousses.

C'est le célèbre J. Hedwig (1) qui, le premier, en 1782, a distingué les organes reproducteurs de ces végétaux et en a précisé les fonctions.

(1) J. HEDWIG, *Fundamentum historiae Muscorum*. Lipsiae, 1782.

Les diverses particularités de leur position relative avaient déjà fixé son attention et, par analogie avec les plantes supérieures, il avait divisé les Mousses en hermaphrodites, monoïques et dioïques.

Ces groupements, maintenus jusqu'ici, ont toujours fourni de précieux éléments à la Systématique.

Depuis lors, l'attention des physiologistes s'est également portée vers l'étude de l'appareil reproducteur, et, dans la seconde moitié du siècle dernier, de remarquables travaux sont venus nous révéler les particularités et les adaptations si diverses des organes des deux sexes, chez les Mousses.

Toutefois, d'importantes lacunes existent encore dans nos connaissances sur la sexualité, notamment en ce qui concerne les espèces dioïques.

C'est ainsi qu'on ignore actuellement si la descendance d'une capsule unique de mousse dioïque est constituée d'individus tous de même sexe ou de sexe différent.

D'autre part, dans la plupart des traités généraux sur la matière, on déclare que les bourgeons multiples provenant de la germination d'une spore unique de mousse dioïque sont, les uns mâles, les autres femelles.

C'est ainsi que Limpricht (1) s'exprime comme suit :

« ... auch bei den zweihäusigen Arten, werden beiderlei Geschlechter auf derselben Protonema angelegt. »

Ruhland (2) est plus affirmatif encore et dit :

« In allen Fällen der Dioëcie, beide Geschlechter neben einander demselben Protonema entspringen. »

(1) K.-G. LIMPRICHT, *Die Laubmoose Deutschlands, Oesterreichs und der Schweiz in Rabenhorts Kryptogamenflora*. Leipzig, 1890, 37.

(2) W. RUHLAND in ENGLER und PRANTL, *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, I, 3, p. 210.

Toutefois cette manière de voir ne paraît pas reposer sur l'expérimentation, mais bien sur l'observation de la continuité organique. Or, on sait combien cette méthode est délicate et expose à de fâcheuses méprises.

D'essais de cultures tendant à suivre l'évolution d'une mousse dioïque, depuis la spore germante jusqu'à la fructification nouvelle, il n'est de trace nulle part, à notre connaissance, dans la littérature du sujet.

On n'y trouve pas davantage d'indications précises sur la sexualité du protonéma.

Le protonéma primaire est-il le siège de la différenciation sexuelle des bourgeons, ou bien ne fait-il que transmettre à ces derniers l'induction de la spore ?

Le protonéma secondaire, d'origine végétative, présente-t-il, au point de vue de la sexualité, les mêmes propriétés que le protonéma de spore dont il se rapproche si étroitement, comme Müller-Thürgau (1) l'a démontré, sous tous les autres rapports ?

Enfin, que doit-on penser de l'opinion émise par Schimper (2) et d'autres bryologues, et d'après laquelle il pourrait exister une véritable transmutation des sexes chez certaines espèces qualifiées cependant de dioïques et qui montreraient des fleurs femelles sur des innovations de tiges ayant porté, l'année précédente, des anthéridies ?

Tels sont les faits importants dont la connaissance manque à l'heure actuelle pour que l'on puisse se former une conception exacte et complète de l'évolution d'une mousse dioïque et dont l'étude, par la méthode expérimentale, fait l'objet du présent mémoire.

(1) MÜLLER-THÜRGAU, *Die Sporenvorkeime und Zwergvorkeime der Laubmoose. Arb. d. bot. Inst. in Würzburg*, Bd I, Heft 4. Leipzig, 1874.

(2) PH. SCHIMPER, *Bryologia europaea*. Stuttgart, 1836-1855.

Mais la réponse à ces questions a une portée qui dépasse les limites de la bryologie.

Elle est à même, en effet, de contribuer à la solution de ce problème intéressant de biologie générale :

Chez les végétaux dioïques, où un œuf fécondé unique donne naissance par division à plusieurs individus, ces derniers sont-ils de même sexe ou de sexe différent?

CHAPITRE PREMIER.

CARACTÈRES SEXUELS DE LA DESCENDANCE DES SPORES D'UNE MÊME CAPSULE.

La première question qui s'offrait à nos investigations était la suivante :

Les spores d'une même capsule de mousse dioïque engendrent-elles des individus de même sexe ou de sexe différent ?

Dans l'établissement des expériences destinées à résoudre cette question, il convenait tout d'abord d'effectuer une sélection rationnelle des espèces pouvant être mises en œuvre.

Choix des sujets d'expériences.

Diverses considérations devaient guider dans ce choix.

1° L'absolue dioécie de l'espèce considérée.

A ce point de vue, il était de première nécessité d'exclure les espèces chez lesquelles la dioécie n'est pas rigoureusement admise par tous les observateurs.

2° La rapidité de développement et la précocité.

Il y a, en effet, de grands avantages à faire porter des recherches de ce genre sur des espèces à développement rapide, produisant leurs organes sexuels de bonne heure.

Non seulement ces espèces précoces livrent plus vite des résultats, ce qui permet de multiplier les essais, mais elles conviennent mieux en ce sens que, produisant en moins de temps des gazonnements compacts, elles se laissent moins facilement envahir par les algues et les champignons.

C'est pourquoi nous avons écarté de nos essais les mousses pleurocarpes et même, parmi les acrocarpes dioïques, un grand nombre de formes qui exigent pour évoluer complètement plus d'une année de végétation.

Il en est également ainsi de la presque totalité des Hépatiques qui évoluent très lentement et qu'il est impossible de suivre en culture pure, pendant plusieurs années, jusqu'à l'obtention de sporogones mûrs.

3° La possibilité de la culture.

Beaucoup de mousses, notamment parmi les espèces corticoles, rupicoles et aquatiques, sont d'une culture très difficile, sinon impossible.

En revanche, un petit nombre d'espèces terrestres, parmi les types ubiquistes, se plient mieux aux conditions artificielles qui leur sont imposées dans les expériences, se développent et même fructifient normalement.

Ces diverses exigences réduisaient à un très petit nombre les espèces adéquates aux conditions de nos expériences.

Après de nombreux essais préliminaires, nous nous sommes arrêtés aux espèces suivantes : *Barbula unguiculata* Hedw. ; *Bryum argentum* L. et *Ceratodon purpureus* Brid.

Technique des cultures.

Pour répondre rigoureusement à la question posée, les semis devaient réaliser une véritable culture pure de spores d'une capsule isolée, et satisfaire aux deux exigences suivantes :

1° Être établis exclusivement à l'aide de spores d'une capsule unique.

2° Rester, dans la suite, indemnes de tout apport de germes de la même espèce de mousse et de plus, autant que possible, de germes d'algues et de champignons.

Voici le mode opératoire suivi :

Les capsules des trois espèces précitées étaient prélevées au moment où, par leurs caractères extérieurs (dimensions, couleur), elles témoignaient de l'état de maturité des spores, mais avant la déhiscence.

La capsule choisie était détachée avec un fragment de son pédicelle, qui devait servir à la manipuler.

Saisie, par cet appendice, au moyen d'une pince stérilisée, elle était immergée et agitée successivement dans plusieurs verres de montre contenant de l'eau stérilisée pour la débarrasser de tous les germes qui auraient pu adhérer à son enveloppe.

Un examen microscopique soigné permettait de vérifier si ce résultat avait été atteint.

La capsule était ensuite écrasée à l'aide d'une pince stérilisée, et le contenu en était délayé dans une capsule de verre avec de la solution minérale nutritive.

Le liquide nutritif suivant nous a fourni d'excellents résultats.

Eau distillée.	1000
Nitrate d'ammoniaque	1
Sulfate de potasse	0.5
Sulfate de magnésie	0.5
Sulfate de chaux	0.5
Phosphate d'ammoniaque.	0.5
Sulfate de fer	0.01
Potasse caustique à 10 % : quelques gouttes.	

Dans quelques essais, la germination s'est effectuée en cristallisoirs de Petri, sur terre arrosée de solution minérale.

Les jeunes semis ont été maintenus à une température voisine de 18° et à la lumière diffuse.

Ces conditions de lumière étaient réalisées par une sorte d'armoire rectangulaire à panneaux de verre, placée dans l'embrasure d'une fenêtre orientée vers le nord.

Les cristallisoirs et les cultures en général y étaient disposés sur des étages également en verre.

On obtenait ainsi le maximum de lumière diffuse, en évitant les rayons directs du soleil, dont l'action calorifique et lumineuse très intense est très nuisible, voire même mortelle aux jeunes protonémas.

Après la germination, les protonémas obtenus en milieu liquide ont été transférés à la surface de petits pots de 5 centimètres de diamètre (godets des jardiniers), contenant une terre de composition variable, adaptée aux exigences de l'espèce considérée.

Les pots et leur contenu étaient au préalable soigneusement stérilisés à l'autoclave à 120° pendant une heure au moins.

Pour assurer la reprise, les cultures étaient maintenues en atmosphère saturée, sous cloche, pendant quelques jours.

Dans la suite, elles étaient disposées dans des couches orientées au nord et abritées en arrière et latéralement contre l'action directe du soleil par une palissade en planches de 3 mètres de haut.

L'aire des couches était formée de cendres recouvertes de sable stérilisé au four.

Des arrosements copieux, à l'aide d'eau stérilisée, maintenaient dans ces couches un état hygrométrique voisin de la saturation. L'air y était renouvelé par une faible ouverture des châssis pendant la nuit.

Les cultures étaient périodiquement arrosées à l'eau stérilisée.

Ainsi traitées, la plupart des cultures demeurèrent pures; un certain nombre furent partiellement envahies par des algues inférieures qui forment, à la surface des pots, une couche glaireuse nuisible au développement des protonémas.

Mais beaucoup plus désastreuse est l'apparition de certaines mucédinées, parmi lesquelles la plus fréquente est une espèce du genre *Verticillium*, que nous ferons connaître ailleurs.

Le champignon attaque les jeunes protonémas et même les tiges feuillées qui, sous son action, meurent et se dessèchent ou pourrissent suivant l'état d'humidité de l'atmosphère ambiante.

Lorsque l'attaque du parasite n'est encore que très localisée, nous avons pu conjurer un envahissement général et la dispersion des spores en cautérisant les parties attaquées à l'aide d'alcool concentré.

Mais lorsque le champignon a pris possession d'une grande partie de la culture, celle-ci est condamnée, et il vaut mieux la détruire.

Quant au danger de voir des contaminations s'effectuer entre mousses de même espèce cultivées côte à côte, en l'absence d'individus présentant des capsules, il ne peut exister que pour les formes donnant naissance à des propagules.

Tel est le cas du *Bryum argenteum*, qui produit des gemmes (4) en abondance et dont la dissémination, notamment en air sec, est très facile.

Aussi les cultures de cette espèce étaient-elles soigneusement isolées. Indépendamment des cultures sur terre en pots, on a effectué des essais en prenant pour substratum, le sable, la tourbe, la moelle de sureau, les fragments de poteries, etc., imprégnés de solution nutritive. Ces diverses particularités et les autres modifications éventuelles de la technique, que nous venons de résumer, seront indiquées dans la relation détaillée qui va suivre de nos séries de cultures.

Dans cet exposé, nous n'indiquerons pas par le menu,

(4) Nous désignons sous cette dénomination des sortes de propagules que Correns appelle *Brutknospen*, dans son important ouvrage : *Untersuchungen über die Vermehrung der Laubmoosen*, p. 175.

toutes les expériences établies pour résoudre le problème posé.

Nous nous bornerons à extraire de notre registre d'expériences, le compte rendu de quelques-unes des cultures les plus démonstratives.

Cultures de *Ceratodon purpureus*.

Cultures 43 à 55 (1).

Le 30 mars 1904, on sème séparément, avec les précautions ci-dessus indiquées, les spores de treize capsules de *Ceratodon purpureus* récoltées sur la crête d'un mur.

Le deuxième jour, on constate un accroissement en diamètre des spores. Le troisième, le contenu cellulaire s'éclaircit, par suite de la digestion progressive des gouttelettes huileuses; le protoplasme recouvert par l'endospore commence à faire hernie au dehors.

A ce stade, on trouve dans la spore de l'amidon transitoire; l'extrémité du boyau germinatif en est encore privée.

Le quatrième jour, les filaments sont très apparents et il est probable que l'assimilation chlorophyllienne s'y effectue déjà; le contenu s'enrichit de plus en plus d'amidon.

Le cinquième jour, les filaments montrent une première cloison et, les jours suivants, continuant à s'allonger, ils se ramifient bientôt.

Le 3 juin, les protonémas des treize capsules sont transplantés en godets remplis de la terre du mur qui nourrissait la mousse mère, additionnée d'un peu de sable pour en tempérer la compacité.

Chaque culture est sous cloche, à l'exposition du nord.

(1) Les numéros correspondent à ceux de notre registre d'expériences.

La reprise se fait normalement et les protonémas s'étendent rapidement, mais dans la suite, les cultures numéros 47, 49, 50 sont envahies par des mucédinées et doivent être détruites (1).

Les autres restent indemnes et donnent de beaux et vigoureux gazonnements.

Du 7 au 9 juillet, les fleurs mâles apparaissent dans les dix cultures.

Le 24 juillet, on constate l'existence, sur d'autres tiges, d'archégonies.

Les plantes mâles disséminées au milieu de tiges encore stériles et de plantes femelles sont plus grêles que ces dernières.

Elles sont terminées par des renflements ovoïdes (gemmes) formés de feuilles florales concaves longuement acuminées. Les anthéridies qui y sont contenues sont oblongues, au nombre de huit à vingt, entremêlées de paraphyses filiformes.

Les fleurs femelles naissent sur des tiges plus vigoureuses et plus ramifiées que les fleurs mâles. Elles sont aussi gemmiformes; les folioles externes de l'involucre sont ovales, lancéolées, acuminées; les folioles internes sont fort engainantes, mais brièvement acuminées. Les archégonies, peu nombreux, sont dépassés de paraphyses filiformes.

Il était très important d'établir, tout au moins pour un certain nombre de cultures, le dénombrement des sexes.

Dans ce but, sur différents points du gazonnement, on a prélevé de nombreuses petites touffes; les éléments de chacune d'elles étaient soigneusement séparés, sous la loupe de Brück, à l'aide d'aiguilles montées, puis examinées au microscope pour en déterminer le sexe.

(1) Il est à remarquer que des diverses espèces mises en œuvre dans ces expériences, c'est le *Ceratodon purpureus* qui est le plus sensible à l'attaque des moisissures.

Le tableau suivant indique pour quatre cultures les nombres d'axes feuillés (1), stériles, mâles et femelles observés, et la proportion de ces divers éléments.

CULTURES.	DATÉS.	AXES STÉRILES		AXES MALES		AXES FEMELLES	
		observés.	%	observés.	%	observés.	%
Nos 43	3 sept. 1905.	62	65	27	29	6	6
—	8 octob. 1905.	45	52	14	16	27	32
46	9 — 1905.	67	30	53	24	104	46
45	10 — 1905.	42	26	32	20	87	54
48	10 — 1905.	61	41	27	19	59	40

Si l'on envisage ces résultats dans leur ensemble, on constate que, chez le *Ceratodon purpureus*, le semis des spores d'une capsule unique produit toujours un mélange d'individus mâles et d'individus femelles.

Les fleurs mâles apparaissent les premières, les fleurs femelles ne deviennent bien visibles que huit à quinze jours après. Le nombre des axes portant des fleurs mâles est prédominant au début.

Comme nous l'avons dit dans l'exposé historique de ce mémoire, des bryologues admettent que chez quelques mousses dioïques, il peut y avoir transmutation des sexes et que notamment des axes de fleurs mâles peuvent donner des innovations fertiles.

(1) Sous le nom d'axes feuillés, nous comprenons non seulement les tiges produites directement sur le protonéma, mais encore leurs ramifications.

Pour contrôler ce fait, on a conservé les cultures de *Ceratodon* dont il vient d'être parlé, jusqu'au printemps, dans une couche établie dans une serre froide.

Au printemps 1905, les gazonnements se remirent à végéter et montrèrent en juillet de nouveaux organes reproducteurs.

Le tableau suivant indique les résultats du recensement des sexes, effectué sur les cultures 43 et 46.

CULTURES.	DATES.	AXES STÉRILES		AXES MALES		AXES FEMELLES	
		observés.	%	observés.	%	observés.	%
N ^{os} 43	16 juillet 1905.	31	72	9	49	4	9
46	Idem.	46	55	42	42	1	3

Si l'on compare les résultats de ce comptage avec ceux enregistrés le 3 septembre 1904, pour le numéro 43, on pourra dresser le tableau suivant :

CULTURES.	DATES.	AXES STÉRILES	AXES MALES	AXES FEMELLES
		%	%	%
N ^o 43	Sept. 1904.	65	29	6
—	Août 1905.	72	49	9

Il est important de constater qu'en juillet 1905, la propor-

tion des sexes dans cette culture de *Ceratodon* est sensiblement la même qu'en septembre 1904 (4).

Cette constatation démontre l'existence d'une grande stabilité dans les caractères sexuels des individus.

De plus, nous avons isolé des tiges portant encore le pédicelle de la capsule, et sur les innovations et ramifications desquelles nous avons constaté, le 15 juillet, la présence d'archégonies à l'exclusion de toute fleur mâle.

Nous reviendrons d'ailleurs plus loin sur cette intéressante question dans le chapitre consacré aux caractères sexuels du protonéma.

Cultures de *Barbula unguiculata*.

Cultures de 1 à 10.

Le 7 mars 1904, on recueille une touffe de *Barbula unguiculata* portant des capsules à divers états de maturité.

L'une d'elles, mûre mais non encore déhiscente, est soigneusement lavée à l'eau stérilisée, à plusieurs reprises.

Son contenu est ensuite étendu sur un cristalliseur de Petri renfermant une couche d'un $\frac{1}{2}$ centimètre de terre argilo-sablonneuse imbibée de solution minérale nutritive.

Le 24 mars, de très beaux protonémas, bien ramifiés, recouvrent visiblement la surface du cristalliseur.

Le 12 avril, on transplante une partie de ces protonémas dans dix godets contenant la même terre que celle du cristalliseur de semis.

Après que la reprise a été effectuée sous cloche, les cultures sont placées, partie sous un châssis, au nord, partie sur une fenêtre du laboratoire, et sous cloche, à la même exposition.

(4) On peut très logiquement comparer les cultures de ces deux époques, car, en septembre 1904 comme en juillet 1905, elles se trouvaient au début de la floraison.

Un mois après, les cultures sont très luxuriantes, les protonémas ont recouvert toute la surface des pots et de nombreuses tiges feuillées sont développées.

Le 13 août, on observe les premières fleurs mâles dans les pots 1 à 5 placés au laboratoire; elles sont rares et les axes qui les portent sont disséminés au milieu de nombreuses tiges stériles.

Trois jours après, ces organes apparaissent également dans les cultures sous châssis.

Le 26 août, on constate l'apparition des fleurs femelles.

Fin octobre, les cultures sont examinées à nouveau avec soin.

Il reste peu de fleurs mâles encore visibles, masquées par des innovations vigoureuses.

Les axes à fleurs femelles sont plus nombreux; chez la plupart d'entre eux, sauf dans les cultures laissées sous cloche au laboratoire, les archégonies sont fécondés.

En novembre, des pédicelles émergent des gazonnements et leur capsule atteint normalement sa maturité en mars 1905.

Cultures 74 à 79.

Le 28 juin 1904, le reste des protonémas développés en cristallisoirs de Petri, à la suite du semis du 7 mars, est transplanté dans cinq godets marqués 74 à 79, remplis de terre prélevée dans une sapinière, terre argilo-sablonneuse très maigre, que l'on arrose de solution minérale nutritive.

La reprise et le développement s'effectuent normalement, sauf pour le n° 77, qui meurt envahi par une mucédinée.

On note comme suit l'apparition des organes sexuels :

Le 14 août, anthéridies dans la culture n° 76	
— 15 — — — 78	
— 15 — — — 79	
— 23 — — — 75	
— 3 septembre, archégonies bien développés dans toutes les cultures.	

Le dénombrement des sexes a été effectué pour la culture n° 79 à trois reprises différentes, les 3 et 25 septembre et le 30 octobre.

Il a donné les résultats renseignés dans le tableau suivant :

CULTURES.	DATES.	AXES STÉRILES		AXES MALES		AXES FEMELLES	
		observés.	%	observés.	%	observés.	%
N° 79	31 sept. 1905.	40	64	16	26	6	10
—	25 sept. 1905.	93	76	14	11	17	13
—	30 octob. 1905.	45	78	5	3	33	19

Ces cultures sont hivernées et donnent lieu à une nouvelle floraison en juillet 1905.

Le tableau ci-dessous indique les résultats d'un comptage des sexes effectué le 17 juillet.

CULTURES.	DATES.	AXES STÉRILES		AXES MALES		AXES FEMELLES	
		observés.	%	observés.	%	observés.	%
N° 79	18 juillet 1905.	152	85	24	13	3	2

La continuité des nouveaux axes femelles avec les axes primaires femelles, encore pourvus de leur capsule desséchée et vide, a été parfaitement établie ici, comme chez le *Ceratodon*.

Culture 15.

Le 15 avril 1904, on a semé, avec les précautions nécessaires, les spores d'une capsule de *Barbula unguiculata* dans un verre de montre contenant de la solution minérale stérilisée.

Le 19 avril, les protonémas sont transférés dans un grand cristalliseur de Petri renfermant de la terre de jardin arrosée de solution minérale.

Le 1^{er} juillet, on transporte les protonémas qui ont déjà émis des tiges, dans un godet rempli de la même terre.

Le 12 septembre, on note l'apparition de fleurs mâles, et le 22 septembre, celle des fleurs femelles.

En novembre, plusieurs jeunes capsules sont déjà apparentes.

Elles mûrissent au printemps 1905 et servent ultérieurement de point de départ aux expériences qui seront relatées plus loin.

Ces diverses cultures de *Barbula unguiculata* démontrent que cette mousse dioïque se comporte comme le *Ceratodon purpureus* : la descendance des spores d'une même capsule est constituée d'individus de sexe différent.

Cultures de *Bryum argenteum*.

Cultures 17 et 18.

Le 11 avril 1904, les spores de deux capsules de *Bryum argenteum* récolté sur un chemin cendré, sont semées séparément en solution minérale nutritive.

Le 19 avril, les protonémas sont transplantés dans deux godets contenant de la terre ordinaire, additionnée de cendres de houille afin de rapprocher sa composition de celle de la station d'origine de la mousse.

Le 18 mai, les cultures sont déjà luxuriantes, de nom-

breux bourgeons feuillés sont développés, mais, chose curieuse, les feuilles ne présentent pas encore de nervure médiane.

Le 11 août, on observe les premières fleurs mâles; le 18, ces dernières sont nombreuses.

Le 11 septembre, on constate la présence de fleurs femelles nombreuses dont beaucoup sont déjà fécondées.

La statistique des sexes fournit les résultats suivants :

CULTURES.	DATES.	AXES STÉRILES		AXES MALES		AXES FEMELLES	
		observés.	%	observés.	%	observés.	%
N ^o 17	7 octobre 1905.	54	67	10	12,5	3	35
—	21 octobre 1905.	55	77	5	7	12	46

Au printemps 1905, les cultures 17 et 18 fournissent des capsules mûres bien constituées.

En juillet, des innovations ont produit une nouvelle génération de fleurs dans une proportion sensiblement correspondante aux chiffres du recensement du 7 octobre ci-dessus.

Culture 158.

Le 18 août 1904, on aensemencé les spores d'une capsule bien stérilisée en solution minérale.

Le 3 septembre, les spores germées ont été répandues à la surface d'un godet rempli de terre argilo-sablonneuse arrosée à l'eau stérilisée.

L'influence du manque d'aliments résultant de cette substi-

tution de l'eau distillée à la solution minérale pour les arrosements, s'est manifestée par un développement très faible avant l'hiver.

Au printemps, la végétation est languissante.

Les tiges, très courtes, montrent le 17 juillet les premiers organes sexuels.

La numération pour ce jour donne :

CULTURES.	DATES.	AXES STÉRILES		AXES MALES		AXES FEMELLES	
		observés.	‰	observés.	‰	observés.	‰
N° 138	17 juillet 1905.	93	88	12	11	1	1

CONCLUSION.

La conclusion qui émane de ces multiples expériences est la suivante :

Les spores d'une même capsule de mousse dioïque donnent toujours un mélange de bourgeons de sexe différent.

CHAPITRE II.

CARACTÈRES SEXUELS DE LA DESCENDANCE D'UNE SPORE.

Le fait que les spores d'une même capsule de mousse dioïque engendrent des individus de sexe différent peut comporter plusieurs interprétations.

1° Les spores dans les capsules sont *hétérogènes* et *unisexuées*; les unes sont mâles, donnent naissance à des protonémas et à des bourgeons tous de ce sexe; les autres sont femelles et engendrent tous individus femelles.

2° Les spores dans les capsules sont *homogènes* et *hermaphrodites*, c'est-à-dire susceptibles de donner chacune, par l'intermédiaire du protonéma, naissance à des individus les uns mâles, les autres femelles.

3° Les spores dans les capsules sont *homogènes* mais *neutres*. Le protonéma, sous l'influence des conditions du milieu ambiant, acquiert une polarité sexuelle qu'il communique aux bourgeons développés sur ses filaments.

Pour déterminer laquelle de ces trois hypothèses répond à la réalité, nous avons eu recours à divers ordres d'expériences.

Nous nous occuperons tout d'abord de ce que nous appelons des *cultures monospores*.

Cultures monospores.

Nous désignons par culture monospore celle qui consiste à *isoler* soigneusement une spore et à la suivre, dans son évolution, jusqu'à la production des organes sexuels.

Ce programme, simple en apparence, est entouré dans sa réalisation de difficultés très sérieuses.

1° La première condition à réaliser, l'obtention d'une spore bien isolée, est rendue très délicate par l'exiguïté de ces germes.

Nous avons cru pouvoir lui appliquer le procédé classique de séparation sur plaques d'agar, tel qu'il est usité en bactériologie.

Mais, après essais, nous avons dû y renoncer malgré sa simplicité, devant les doutes qu'il laisse subsister quant au parfait isolement des spores. Celles-ci peuvent rester agglutinées et former des colonies dont l'examen microscopique des plaques est impuissant à révéler l'origine multiple.

Aussi recourons-nous, comme il est indiqué plus loin, aux dilutions fractionnées et au contrôle microscopique.

2° Une très grande difficulté à vaincre résulte de la contamination presque inévitable des cultures pendant l'isolement des germes, et, dans la suite, durant leur évolution.

Cette contamination est d'autant plus à redouter que le protonéma de spore unique ne recouvre le sol mis à sa disposition que très lentement, laissant ainsi le champ libre aux commensaux et aux parasites.

Aussi les échecs ont-ils été très nombreux et la proportion de cultures réussies, très faible.

Technique des cultures monospores.

Les spores d'une capsule bien lavée sont diluées dans un verre de montre rempli aux deux tiers de la solution nutritive.

La germination s'effectue et, dès que les protonémas sont devenus bien visibles, c'est-à-dire après huit ou quinze jours, on tente leur séparation.

A cette fin, on prélève à l'aide d'une pipette stérilisée une goutte de la solution qui nourrit les protonémas et dans laquelle ces derniers sont déjà très dilués.

L'examen microscopique sur porte-objet stérilisé fait voir si la goutte contient plusieurs spores germées.

Dans l'affirmative, on les dilue encore avec de l'eau stérilisée; cette nouvelle dilution est aspirée dans une autre pipette, puis déposée en gouttelettes sur des porte-objets stérilisés.

Celles-ci sont soumises à l'examen microscopique.

Une cause d'erreur fréquente, dans cet examen, c'est le fait que des spores non encore germées ou des protonémas de faibles dimensions peuvent être dissimulés dans le bord obscur de la goutte.

Aussi faut-il explorer celle-ci méthodiquement, par zones parallèles, se croisant à angle droit et en n'oubliant pas d'effectuer une nouvelle mise au point, chaque fois que le ménisque de la goutte se présente dans le champ visuel.

Lorsque, à la suite de ces nombreux tâtonnements, on a réussi à isoler un protonéma vigoureux dans une goutte, on l'aspire à l'aide d'une pipette et on le dépose sur le milieu de culture où il devra accomplir son évolution.

Dans la majorité des cas, nous nous sommes servis de petits pots renfermant de la terre fine et à surface bien régulière, afin que le jeune protonéma ne tombe pas dans une dépression au fond de laquelle, faute de lumière, il dépérirait infailliblement.

Pots et contenu avaient préalablement été stérilisés à l'autoclave pendant deux heures à 120°.

Telle est la technique qui nous a le mieux réussi et qui nous a permis d'obtenir un certain nombre de cultures strictement monospores de *Bryum argenteum* et de *Barbula unguiculata*.

Quant au *Ceratodon purpureus*, les semis effectués ont été détruits par les mucédinées; un seul est resté indemne et a servi à établir une expérience sur l'action de l'aliment sur le protonéma, dont il sera question dans le chapitre suivant.

Cultures de *Bryum argenteum*.

Cultures 115 à 119.

Le 18 août 1904, on a semé en solution minérale les spores d'une capsule bien lavée de *Bryum argenteum*.

Le 31 août, les protonémas sont suffisamment développés et on réussit, par le procédé ci-dessus, à en isoler huit qui sont

placés chacun au centre d'un godet contenant de la terre de jardin copieusement additionnée de cendres de houille très fines.

Le développement est assez lent, le protonéma s'étend en rayonnant et finit cependant par recouvrir toute la surface du pot; en octobre, des tiges feuillées nombreuses, mais très courtes, forment un gazonnement épais.

L'hivernage s'effectue dans une couche établie dans une serre froide à l'abri de l'action directe du soleil.

Les arrosements ont été ménagés et l'aération a été active afin d'empêcher l'envahissement par les champignons.

Malgré ces précautions, trois cultures sont atteintes et doivent être sacrifiées.

Pendant les premiers mois du printemps de 1905, les tiges ne s'allongent que très faiblement; ce n'est qu'en mai, juin qu'elles croissent vigoureusement; dès lors, on les examine attentivement pour saisir l'apparition des organes sexuels.

Le 2 juillet, le numéro 117 montre les premières fleurs mâles. Quelques jours après, elles sont extraordinairement nombreuses.

Aucune fleur femelle n'est visible, même lors des examens ultérieurs : la culture est donc *exclusivement mâle*.

Le 7 juillet, dans le numéro 119 on compte des axes terminés par des archégones; aucun ne présente de fleurs mâles et cette situation se maintient dans la suite.

Les numéros 116 et 118 montrent de très nombreuses tiges mâles, dès le 16 juillet. A la fin du mois, ces deux gazonnements ont rigoureusement conservé leur caractère unisexué.

Dans le numéro 115, le 21 juillet, on observe des tiges femelles, mais aucun organe mâle.

Sur cinq cultures provenant de spores isolées d'une même capsule de *Bryum argenteum*, on en compte donc *trois exclusivement mâles* et deux *exclusivement femelles*.

Cultures de *Barbula unguiculata*.

Cultures 502 à 511.

Le 20 avril 1905, on isole en godet dix jeunes protonémas de *Barbula unguiculata*; huit d'entre eux se développent et donnent, en six semaines, un protonéma recouvrant toute la surface des godets et portant déjà des tiges feuillées.

Fin juin, l'examen comparatif des cultures fait constater des différences appréciables. Trois d'entre elles, les numéros 503, 504, 508, présentent des gazonnements serrés de tiges courtes d'un vert clair; dans les cinq autres, les tiges sont moins serrées mais plus grandes et d'un vert plus sombre.

Le 17 juillet, plusieurs axes des numéros 503, 504, 508 montrent des anthéridies, les autres cultures sont encore stériles.

Le 21 juillet, seuls les archégonés apparaissent dans les numéros 507, 509, 510, 511.

Le numéro 502 est à cette date encore stérile.

Sur sept cultures monospores fleuries au 21 juillet, il y en avait donc trois rigoureusement mâles et quatre exclusivement femelles.

Comme on l'avait observé dès la fin juin, la culture mâle est d'un vert plus clair, formée de tiges plus courtes à floraison plus précoce que les gazonnements femelles.

CONCLUSION.

Ces diverses cultures monospores permettent d'établir la conclusion suivante :

Lorsqu'on sème séparément les spores d'une même capsule de mousse dioïque, on obtient pour chacune d'elles un protonéma produisant des bourgeons de sexe uniforme; certaines spores produisent un protonéma à bourgeons tous mâles, d'autres spores produisent un protonéma qui engendre uniquement des bourgeons femelles.

CHAPITRE III.

CARACTÈRES SEXUELS DU PROTONÉMA.

La conclusion qui se dégage des expériences de cultures monospores qui viennent d'être décrites écarte définitivement l'hypothèse de spores hermaphrodites, c'est-à-dire capables de donner individuellement naissance à des bourgeons mâles et à des bourgeons femelles, sur un même protonéma.

Mais elle laisse debout la question de savoir si le sexe des bourgeons qu'engendre une spore est déterminé dans cette dernière (hypothèse des spores unisexuées), ou bien si cette sexualité apparaît durant la vie du protonéma (hypothèse des spores neutres).

Le protonéma des mousses constitue, en effet, un élément qui, par ses caractères morphologiques aussi bien que par son mode de vie, diffère si profondément de la plante feuillée, que l'on concevrait aisément qu'il s'individualisât au point d'acquiescer, sous l'influence des agents du milieu, une polarité sexuelle déterminée.

S'il en était ainsi, le protonéma devrait se montrer plastique à ce point de vue et sa sexualité devrait être sujette à des variations imprimées soit par les facteurs physiques, soit par l'aliment.

Si, au contraire, l'expérience montre que le protonéma transmet fidèlement l'induction sexuelle qu'il a reçue, que la sexualité y est fixe et incapable de se modifier par l'effet de l'ambiance, on pourra en conclure que la polarité des bourgeons ne prend pas sa source dans cet organe, mais est déjà déterminée dans la spore.

Cultures individuelles.

Nous venons d'indiquer l'intérêt qui s'attache à la détermination du sexe du protonéma et à celle de la fixité de ce caractère.

Dans cet ordre de recherches, il était nécessaire de prendre tout d'abord comme point de départ, le protonéma secondaire émis par voie purement végétative aux dépens de portions d'individus de sexe bien connu.

Les connaissances ainsi acquises devaient ensuite éclairer l'étude des propriétés du protonéma primaire, qui lui ne révèle sa sexualité que lors de la floraison des bourgeons.

Chez les mousses, le pouvoir de régénération est remarquable.

Placés dans des conditions favorables, des fragments de tiges développent un protonéma (protonéma secondaire) dont l'extension est illimitée et donnant des bourgeons comme s'il provenait de spores; des feuilles détachées, des propagules, dans certains cas, des rhizoïdes, se comportent de même.

Nous désignerons sous le nom de *culture individuelle*, la culture d'un protonéma provenant ainsi par voie de régénération d'un individu ou d'un fragment d'individu unique.

Nous avons réalisé comme suit ces cultures individuelles :

Après lavages répétés, à l'eau stérilisée, une tige est choisie de sexe bien déterminé, feuillée ou plus souvent dépouillée de ses feuilles, de son bourgeon terminal et de son extrémité inférieure. L'ablation de cette dernière est rendue nécessaire par ce fait que le bas de la tige est souvent abondamment pourvu de rhizoïdes ou de filaments de protonéma qui se confondent aisément avec les organes similaires des tiges voisines.

Un examen microscopique soigné montre alors un axe dépourvu de tout filament ou germe étranger.

Cet individu laissé entier ou divisé en fragments est placé

en liquide nutritif dans des cristallisoirs de Petri ou sur terre appropriée en pots.

La régénération a lieu à l'étouffée, sous cloche, à la lumière diffuse et à une température moyenne de 18°.

Après un laps de temps variant de quinze jours à un mois, un protonéma abondant s'est développé.

Il est alors transféré en godet, sur terre, parfois sur agar nutritif. Ultérieurement, ces cultures sont traitées comme les semis monospores.

La régénération par feuille s'est effectuée de la même façon.

A remarquer ici que ces organes devaient de préférence être entièrement séparés de leur support, la connexion avec la tige empêchant d'ordinaire la production du protonéma.

Le processus de régénération ne pourrait-il trouver son explication dans ce fait, que les réserves des feuilles encore attachées émigrent vers les points végétatifs de l'axe qui les porte? Au contraire, chez les feuilles détachées, il se produit une irritation, et un courant des matériaux plastiques de réserves et d'assimilation, vers la blessure, favorise l'émission d'un protonéma secondaire.

Culture de *Barbula unguiculata*.

Culture 118.

Le 31 août 1904, une tige mâle, traitée comme il vient d'être indiqué, est mise à régénérer et transplantée, vingt-huit jours après, en godet avec terre ordinaire.

Un mois plus tard, la culture forme un gazonnement compact de tiges courtes qui, après hivernage, se remettent à végéter activement en juin.

Le 7 juillet, nous constatons l'existence de plusieurs fleurs mâles; quelques jours après, ces dernières terminent presque tous les axes; aucune fleur femelle n'apparaît.

Cultures 360 à 363.

Le 24 avril, on prélève, dans la culture 118, quatre petites touffes de protonéma avec tiges, que l'on repique dans des pots sous les numéros 360 à 363.

La reprise s'effectue bien, sauf pour les numéros 360 et 361, qui sont envahis par un *Verticillium*.

L'apparition des organes mâles a lieu dès les premiers jours de juillet, dans les deux cultures 362 et 363.

Le 15 du même mois, presque tous les axes sont couronnés par des anthéridies, à l'exclusion de toute fleur femelle.

Culture 147.

Le 10 septembre 1904, une tige mâle est traitée comme précédemment; on en obtient une culture qui, hivernée, montre, le 6 juillet 1905, les premières fleurs mâles; le 21, elles sont extrêmement nombreuses; aucune fleur femelle.

Cultures 261 et 262.

Le 16 décembre 1904, des feuilles détachées d'une plante femelle fructifiée, soigneusement lavées et examinées, isolément au microscope, pour s'assurer qu'elles ne sont accompagnées d'aucun fragment de feuilles ou de protonéma étrangers, sont mises à régénérer.

Le 1^{er} mars 1905, deux de ces feuilles ont développé un abondant protonéma et sont transplantées en godet.

Le développement est normal.

Le 3 juillet, on observe des fleurs femelles.

A la fin juillet, ces fleurs sont nombreuses et aucune anthéridie n'est visible.

La culture 262 est un peu plus en retard; l'examen microscopique n'y fait déceler, le 16 juillet, que des archégonies.

Cultures 405 à 408.

Le 1^{er} mars 1905, quatre tiges femelles dépouillées de feuilles sont placées directement en godet en atmosphère confinée.

L'extension du protonéma est rapide, et l'on obtient, en mai, des gazonnements compacts de tiges feuillées.

Le 20 juillet, apparition des archégonés, aucune trace d'antheridies.

Ces cultures sont donc rigoureusement unisexuées et du même sexe que les tiges mères.

Cultures de *Bryum argenteum*.

Cultures 120 à 123.

Le 1^{er} septembre 1904, on met directement en godet, sur terre additionnée de cendres, quatre tiges traitées comme il a été dit plus haut de *Bryum argenteum*.

Le n° 120 est une tige mâle.

— 121	—	—
— 122	—	femelle.
— 123	—	mâle.

Ces quatre cultures sont traitées de façon identique et leur développement est parallèle.

Le 2 juillet 1905, les fleurs femelles apparaissent dans le numéro 122; les fleurs mâles se montrent dans les numéros 120, 121 et 123.

Dans ces trois cultures et spécialement dans les numéros 120 et 123, le nombre des axes terminés par des fleurs mâles est très considérable; dès le 10 juillet, on en compte dix-sept sur vingt-quatre examinés.

A la fin juillet, des innovations nombreuses se sont produites; elles s'insèrent sous les fleurs, plusieurs d'entre elles

sont couronnées par de nouvelles anthéridies. Les fleurs femelles sont absentes.

En revanche, le numéro 122 reste exclusivement femelle.

Cultures 284 à 292.

Le 31 mars 1905, trois tiges de sexe déterminé sont découpées chacune en trois morceaux qui servent à établir les cultures suivantes :

Nos 284	}	fragments de tige mâle.
285		
286		
287		
288		
289	}	fragments de tige femelle.
290		
291		
292		

Ces douze cultures se développent vigoureusement et, dès le 30 juin, les fleurs se manifestent.

Le tableau suivant résume les constatations effectuées sur la sexualité de ces cultures à la fin juillet.

CULTURES.	SEXE DE LA PLANTE MÈRE.	SEXE DES AXES NOUVEAUX.
Nos 284	Mâle.	Uniquement mâles.
285	Idem.	Idem.
286	Idem.	Idem.
287	Idem.	Idem.
288	Idem.	Idem.
289	Idem.	Idem.
290	Femelle.	Uniquement femelles.
291	Idem.	Idem.
292	Idem.	Idem.

Culture 160.

Le 14 septembre 1904, un propagule gemmiforme, développé sur un rhizoïde épigé à la base d'une tige femelle, est mis à régénérer.

Le protonéma développé est transplanté, le 24 septembre, en godet sur terre additionnée de cendres.

La culture résiste à l'hiver et se remet à végéter en mai-juin.

Résultats de l'examen microscopique : le 13 juillet, plusieurs fleurs femelles, 0 mâle; le 20 juillet, très nombreuses fleurs femelles, 0 mâle.

Cultures 254 à 255.

Le 27 février 1905, deux feuilles isolées d'une plante mâle de *Bryum* sont mises à régénérer sur tessons baignant dans la solution minérale, en boîte de Petri.

Le 7 mars, les protonémas sont transplantés en godets, même terre que précédemment.

Le 7 juillet, les fleurs mâles apparaissent nombreuses à l'exclusion de toute fleur femelle dans les deux cultures.

Le 21 juillet : fleurs mâles sur presque tous les axes; 0 fleur femelle.

Le protonéma secondaire de feuilles jouit donc des mêmes propriétés au point de vue de la transmission du sexe que celui engendré par les tiges.

L'expérience suivante montre qu'il en est de même du protonéma produit par les propagules.

Cultures 266 et 267.

Le 2 mars 1905, deux gemmes d'une plante mâle sont mises à régénérer puis transplantées isolément sur godet.

Une des cultures, le numéro 267, envahie par les mucédinées, est sacrifiée; le numéro 266 se développe normalement.

Résultats de l'examen microscopique, 2 juillet : fleurs mâles nombreuses, 0 femelle.

Le 19 juillet : presque tous les axes primaires et les innovations nouvelles couronnés d'anthéridies.

Cultures de *Ceratodon purpureus*.

Cultures 130 à 132.

Le 3 septembre 1904, trois sommités de tiges, de sexe connu, sont, après régénération, placées sur terre ordinaire en godets.

La culture 130 dérive d'une tige femelle.

—	131	—	mâle.
	132	—	—

Ces cultures passent l'hiver en couche et se remettent à végéter en mai-juin.

Le 1^{er} juillet, on constate l'apparition de fleurs mâles dans les numéros 131 et 132.

Le 15 juillet, les archégonies sont nombreux dans le numéro 130.

Les trois cultures restent rigoureusement unisexuées.

Cultures 564 à 566.

Elles constituent l'extension d'une partie de la culture 130 de laquelle on prélève trois touffes de protonéma avec tiges, que l'on repique en godets.

Résultat de l'examen microscopique :

20 juillet : nombreuses fleurs femelles dans les trois cultures; 0 fleur mâle.

Culture 323.

Des feuilles isolées d'une plante mâle sont mises à régénérer le 28 février 1905 ; une seule d'entre elles donne un protonéma qui est repiqué en godet.

Le 6 juillet, les fleurs mâles sont nombreuses ; quelques jours après, elles garnissent presque tous les axes.

Absence complète de fleurs femelles.

CONCLUSION.

Ces nombreux essais de culture de protonémas secondaires concourent, sans exception, à établir le fait important suivant :

Le protonéma secondaire ou de régénération d'une mousse dioïque, qu'il provienne de tige, de feuilles ou de propagule, transmet fidèlement aux bourgeons nouveaux les caractères sexuels de la plante mère.

CHAPITRE IV.

ACTION DU MILIEU SUR LA SEXUALITÉ DU PROTONÉMA.

Les expériences qui viennent d'être relatées ont démontré que le protonéma d'une mousse dioïque transmet fidèlement aux bourgeons auxquels il donne naissance les caractères sexuels de la plante mère.

Dans ces cultures, les conditions de développement du protonéma secondaire, tant au point de vue de l'aliment qu'à celui des agents physiques : chaleur, lumière, humidité, sont restées semblables à celles qui avaient présidé à l'évolution de l'ascendant direct.

On est en droit de se demander si, en faisant varier ces conditions, on n'ébranlerait pas cette fixité de la polarité sexuelle.

Dans la relation des expériences établies pour élucider cette question, nous laisserons systématiquement de côté l'examen des modifications variées qu'impriment au développement des Mousses, les facteurs du milieu.

Depuis plusieurs années, au cours de recherches biologiques sur les Bryophytes, nous avons eu l'occasion de suivre l'action des agents physiques et de l'aliment sur la germination, la croissance, la floraison et la fructification d'un assez grand nombre de types spécifiques.

Ces constatations nous ont prouvé qu'à ces multiples points de vue, les Mousses obéissent, en général, aux lois qui régissent, dans le règne végétal, l'influence des facteurs du milieu ambiant.

Nous réserverons donc cette question, pour n'envisager uniquement que l'action de ces agents sur le déterminisme de la sexualité.

Facteurs physiques.

Les cultures qui ont été soumises à l'action modificatrice des agents physiques étaient les suivantes :

1. Cultures de protonéma secondaire de tige mâle de *Bryum argenteum*.

2. Cultures de protonéma secondaire de tige femelle de *Barbula unguiculata*.
3. Fragments de culture monospore, jeune, de *Barbula unguiculata*, qui, dans les conditions normales, s'est montrée par la suite exclusivement mâle.
4. Fragments de culture monospore, jeune, de *Bryum argenteum* mâle.

Lumière.

Quatre séries des cultures ci-dessus ont été disposées, en avril 1905, comme suit :

1. Une à la lumière diffuse pleine;
2. Une autre à la lumière diffuse faible;
3. Une troisième sous verre bleu;
4. Une quatrième sous verre rouge orangé.

En juillet, l'examen microscopique ne montre aucune modification de sexe.

Chaleur.

Trois séries de cultures sont placées, en avril 1905, en serres, aux températures moyennes ci-après :

- Première série, à la température moyenne de 10 à 18°;
- Deuxième série, à la température moyenne de 18 à 23°;
- Troisième série, à la température moyenne de 23 à 27°;

Aucune action perturbatrice sur les caractères sexuels ne s'est produite.

Humidité.

De deux séries de cultures, l'une est maintenue, dès avril 1905, sous cloche, en atmosphère toujours saturée; l'autre est placée dans une couche entr'ouverte la nuit et le jour, par temps couvert, et ne reçoit que les arrosements strictement nécessaires.

En juillet, les caractères sexuels apparaissent sans modifications dans les deux séries.

Aliment.

Quelques exemples classiques de modification du sexe par l'aliment, dans le règne animal, ont engagé les botanistes à rechercher si, chez les plantes dioïques, la proportion entre les individus mâles et les individus femelles varie sous l'influence de la nutrition.

É. Laurent (1) a notamment constaté que, chez l'Épinard, l'azote et la chaux favorisent la production de plantes mâles, tandis que l'acide phosphorique et la potasse déterminent la production, en plus grand nombre, de sujets femelles.

Ce savant, de plus, a poursuivi l'étude de l'influence de l'aliment sur la descendance des plantes soumises, pendant leur végétation, à l'action prépondérante d'un élément nutritif.

Il nous a été impossible d'effectuer, jusqu'ici, un travail similaire sur les mousses dioïques, car celui-ci, devant porter sur des générations successives, exigerait plusieurs années d'expérimentation.

Nous avons fait agir l'alimentation directement sur le protonéma de spore et sur le protonéma de régénération, dans le seul but de rechercher si ce facteur est capable d'y amener une modification de la polarité sexuelle.

Dans nos expériences, nous avons spécialement fixé notre attention sur les éléments suivants : azote, phosphore et potassium, comme étant ceux dont l'excès ou le manque relatif déterminent les effets généraux les plus marqués sur les végétaux.

Le choix d'un substratum convenable a fait l'objet de nombreux essais préliminaires.

Ces derniers ont dû faire écarter la méthode classique des cultures aqueuses, comme peu compatible avec une évolution normale des espèces terrestres utilisées dans nos recherches.

L'agar et la silice gélatineuse peuvent être utilisés, mais le développement y est lent.

(1) É. LAURENT, *De l'influence de l'alimentation minérale sur la production des sexes chez les plantes dioïques.* (COMPTES RENDUS, t. CXXXVII, p. 689.)

Le sable pur ne convient pas non plus très bien comme support physique ; au surplus, il est singulièrement favorable à la pullulation des algues.

Nous nous sommes arrêtés à une terre argilo-sablonneuse provenant de Ferooz, qui est remarquable par sa pauvreté en principes fertilisants (1).

Voici l'analyse chimique complète des parties fines de cette terre :

Mille parties de terre sèche renferment :

Matières combustibles et volatiles.	} 37.12 renfermant	}	Azote organique	1.69
			— ammoniacal	0.02
			— nitrique	0.01
			— total	1.72
Soluble à froid dans l'acide chlorhydrique à 1.48 de densité.	} 43.86 renfermant	}	Oxyde de fer et alumine.	30.96
			Chaux	5.96
			Magnésie	3.48
			Soude	0.28
			Potasse	0.33
			Acide phosphorique (2) .	0.44
			— sulfurique	0.27
			— carbonique	2.41
— silicique	0.04			
			Chlore	0.02
Insoluble à froid dans l'acide chlorhydrique.	} 919.02 renfermant	}	Potasse	22.21
			Chaux	3.68
			Magnésie	1.20
			Oxyde de fer et alumine.	104.54
			Acide phosphorique . .	traces
	4,000.00			

(1) Cette terre a été très obligeamment mise à notre disposition par M. A. Grégoire, directeur de l'Institut chimique et bactériologique de Gembloux, qui nous en a, de plus, communiqué l'analyse chimique reproduite ci-dessus.

(2) Renfermant acide phosphorique soluble dans le citrate d'ammoniaque alcalins traces.

Cette terre, grâce à une très faible teneur en azote et en acide phosphorique, permet de mettre nettement en évidence, chez les végétaux supérieurs, les effets de l'addition de l'un ou l'autre de ces éléments au milieu nutritif.

Toutefois, il est à remarquer que, même en l'absence de tout apport d'azote et d'acide phosphorique, cette terre peut encore nourrir une végétation très notable de mousses, ce qui est dû aux faibles exigences de ces végétaux sous le rapport de ces éléments.

Ce substratum, favorable au point de vue physique à la vie des mousses étudiées, était additionné de divers mélanges nutritifs.

La base de ces mélanges était constituée par la solution minérale dont la composition a été signalée à la page 9.

Pour chaque élément nutritif étudié, on a ainsi établi une série de cultures dans l'une desquelles il n'y avait de cet élément que la faible quantité contenue dans la terre utilisée, et dont les autres en présentaient des doses croissantes jusque $2\frac{1}{2}$ à 5 ‰.

Ces grands écarts entre les taux extrêmes d'éléments nutritifs en doivent certainement faire ressortir l'action spécifique éventuelle sur la production des sexes.

La terre, imprégnée de liquide nutritif, était disposée dans des cristallisoirs de Petri de 6 centimètres de diamètre et de 2^{cm}5 de haut.

Dans ces récipients, l'atmosphère reste saturée, l'évaporation et la transpiration sont faibles. On atténue ainsi le danger de voir les solutions nutritives se concentrer et ne plus maintenir entre elles les différences de composition centésimale du début.

Nous avons ainsi obtenu des végétations normales qui ont pu être suivies jusqu'à la fructification.

Dans d'autres cas, nous nous sommes servis de godets placés sous cloches, reposant sur des soucoupes qui contenaient également le liquide nutritif.

De cette façon, l'atmosphère était saturée et l'on évitait la

diffusion et le mélange des solutions nutritives différentielles qui se seraient inévitablement produits si les pots avaient été disposés côte à côte, sur une aire commune.

Pour le surplus, ces cultures étaient conduites de la même façon que les cultures individuelles.

Cultures de *Bryum argenteum*.

Cultures 272 à 283.

Le 27 février 1905, on met isolément en régénération, en solution minérale sur tessons, des tiges mâles, feuillées, de *Bryum argenteum*.

Le 29 mars, elles ont développé un abondant protonéma. Trois d'entre elles sont découpées chacune en quatre fragments; ces douze portions de tiges mâles avec protonéma sont placées, séparément, dans des cristallisoirs de Petri contenant de la terre de Ferooz additionnée, suivant les cultures, des liquides minéraux que voici :

Nos 272 : Solution minérale complète.

273 :	—	—	plus 2 1/2 ‰ de nitrate ammonique.
274 :	—	—	plus 5 ‰ de nitrate ammonique.
275 :	—		sans azote.
276 :	—		complète.
277 :	—	—	plus 1 1/2 ‰ de phosphate ammonique.
278 :	—	—	plus 2 1/2 ‰ de phosphate ammonique.
279 :	—		sans acide phosphorique.
280 :	—		complète.
281 :	—	—	plus 1 1/2 ‰ de sulfate de potasse.
282 :	—	—	plus 2 1/2 ‰ de sulfate de potasse.
283 :	—		sans potassium.

Partout, la reprise s'effectue bien et le protonéma s'étend rapidement.

Les différences entre les cultures sont peu apparentes et même, en l'absence d'apport au sol, d'azote, d'acide phosphorique et de potasse, les gazonnements se recouvrent, dès le commencement de mai, d'abondantes tiges feuillées.

Le tableau suivant indique la nature et la date d'observation, dans chaque culture, des organes reproducteurs.

CULTURES.	SEXE OBSERVÉ.	DATE D'OBSERVATION des fleurs.
N ^o 272	Exclusivement mâle.	15 juillet.
273	Idem.	24 —
274	Idem.	24 —
275	Idem.	23 —
276	Idem.	23 —
277	Idem.	15 —
278	Idem.	20 —
279	Idem.	30 juin.
280	Idem.	21 juillet.
281	Idem.	15 —
282	Idem.	21 —
283	Idem.	14 —

Ces cultures restent donc exclusivement du sexe de la plante mère, malgré les grands écarts de composition du milieu nutritif.

Cultures 390 à 401.

Le 5 avril 1905, on prélève, dans la culture monospore de *Bryum* numéro 118 (1), des petites touffes de tiges encore entremêlées de protonéma primaire.

Ces touffes, aussi identiques que possible, sont réparties dans des godets contenant de la terre pauvre de Ferooz.

Les solutions minérales suivantes sont utilisées :

N^{os} 390 : Solution minérale complète.

391 : — plus 2 1/2 ‰ de nitrate ammonique.

392 : — plus 5 1/2 ‰ —

393 : — sans azote —

394 : Solution minérale complète.

395 : — plus 1 1/2 ‰ de phosphate ammonique.

396 : — plus 2 1/2 ‰ —

397 : — sans acide phosphorique.

398 : Solution minérale complète.

399 : — plus 1 1/2 ‰ de sulfate de potasse.

400 : — plus 2 1/2 ‰ —

401 : — sans potassium.

En atmosphère saturée, sous cloche, la reprise des protonémas est rapide et l'on obtient, après six semaines, des gazonnements complets.

(1) Voir p. 24.

Les observations microscopiques effectuées à leur égard sont résumées ci-dessous.

CULTURES.	SEXE OBSERVÉ.	DATE D'OBSERVATION des fleurs.
N ^o 390	Exclusivement mâle.	7 juillet.
391	Idem.	15 —
392	Idem.	15 —
393	Idem.	10 —
394	Idem.	8 —
395	Idem.	17 —
396	Idem.	17 —
397	Idem.	15 —
398	Idem.	7 —
399	Idem.	15 —
400	Idem.	14 —
401	Idem.	20 —

Ces cultures restent exclusivement mâles, comme l'est la culture monospore 118, dont elles proviennent.

Cultures de *Barbula unguiculata*.

Cultures 324 à 335.

Le 19 avril 1904, on prélève, dans un gazonnement de *Barbula unguiculata*, plusieurs tiges portant des capsules non mûres.

Ces tiges femelles sont découpées chacune en trois ou quatre fragments, qui sont mis à régénérer isolément.

Après obtention d'un protonéma abondant, les portions de tiges sont repiquées, séparément, dans des godets contenant la terre pauvre qui a servi aux expériences précédentes.

On imprègne les cultures des solutions nutritives suivantes :

Nos 324 : Solution minérale complète.

325 : — — plus $2\frac{1}{2}$ ‰ de nitrate ammonique.

326 : — — plus 5 ‰ —

327 : — sans azote.

328 : Solution minérale complète.

329 : — — plus $1\frac{1}{2}$ ‰ de phosphate ammonique.

330 : — — plus $2\frac{1}{2}$ ‰ de phosphate ammonique.

331 : — sans acide phosphorique.

332 : Solution minérale complète.

333 : — — plus $1\frac{1}{2}$ ‰ de sulfate de potasse.

334 : — — plus $2\frac{1}{2}$ ‰ de sulfate de potasse.

335 : — sans potassium.

Reprise et développement s'effectuent normalement.

Le résultat de l'examen microscopique est consigné dans le tableau suivant :

CULTURES.	SEXE OBSERVÉ.	DATE D'OBSERVATION des fleurs.
N ^{os} 324	Exclusivement femelles.	16 juillet.
325	Idem.	23 —
326	Idem.	24 —
327	Idem.	22 —
328	Idem.	16 —
329	Idem.	20 —
330	Idem.	22 —
331	Idem.	21 —
332	Idem.	15 —
333	Idem.	21 —
334	Idem.	18 —
335	Idem.	22 —

Une série identique de cultures effectuées à la même époque avec des fragments de tiges femelles, a fourni des résultats qui corroborent entièrement les précédents.

Cultures de Ceratodon purpureus.

Cultures 540-549.

Comme nous l'avons dit précédemment, les essais de semis monospores de cette espèce ont échoué à cause de la sensibilité de son protonéma à l'attaque des mucédinées.

Un seul protonéma, isolé, d'un semis effectué le 7 novembre 1904, transplanté en godet le 21 décembre, a fourni une culture qui a pu être hivernée avec succès.

Le 6 avril 1905, on divise cette culture en dix portions aussi semblables que possible, qui sont repiquées dans les godets avec terre de Ferooz.

Les solutions suivantes sont incorporées aux cultures :

N^{os} 540 : Solution minérale complète.

541 :	—	+ 2 1/2 ‰ de nitrate ammonique.
542 :	—	+ 5 ‰ de nitrate ammonique.
543 :	—	sans azote.
544 :	—	+ 1 1/2 ‰ de phosphate ammonique.
545 :	—	+ 2 1/2 ‰ —
546 :	—	sans acide phosphorique.
547 :	—	+ 1 1/2 ‰ de sulfate de potasse.
548 :	—	+ 2 1/2 ‰ —
549 :	—	sans potassium.

Les cultures sont placées après la reprise dans une couche au nord, modérément confinée, afin d'éviter le développement des mucédinées.

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus.

CULTURES.	SEXE OBSERVÉ.	DATE D'OBSERVATION des fleurs.
N ^o 540	Exclusivement femelles.	22 juillet.
541	Idem.	20 —
542	Idem.	23 —
543	Idem.	21 —
544	Idem.	19 —
545	Idem.	24 —
546	Idem.	25 —
547	Idem.	22 —
548	Idem.	22 —
549	Idem.	22 —

Les diverses portions de protonéma de spore de *Ceratodon*, soumises à des variations d'alimentation très importantes, n'en ont pas moins tous bourgeons du même sexe, du sexe femelle déterminé dans la spore.

CONCLUSIONS.

Les expériences qui précèdent démontrent que :

L'action des facteurs du milieu, envisagée dans les limites d'une génération, est incapable de modifier les caractères sexuels du protonéma, que celui-ci résulte de la germination de la spore ou qu'il ait une origine végétative.

Chez les mousses dioïques, le protonéma, lui aussi, est dioïque et transmet sans modification l'induction sexuelle qu'il a reçue directement (protonéma primaire) ou indirectement (protonéma secondaire) de la spore.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Si l'on coordonne les résultats partiels des chapitres précédents, on est amené à formuler les conclusions générales suivantes :

Chez les mousses dioïques étudiées :

1. *Les spores d'une même capsule sont, au point de vue des caractères sexuels, hétérogènes.*

2. *Ces spores sont unisexuées : les unes, mâles, donnent naissance à un protonéma qui transmet cette polarité sexuelle à tous les bourgeons qui en dérivent ; les autres, femelles, ne produisent que des bourgeons femelles.*

3. *L'induction sexuelle se transmet fidèlement, par l'intermédiaire du protonéma secondaire, dans les divers modes de propagation végétative de la plante sexifère.*

4. *L'action des facteurs du milieu, envisagée dans les limites d'une génération, est incapable de modifier la polarité sexuelle du protonéma et celle des bourgeons qui en dérivent.*

Comme on le voit par l'ensemble de ces résultats, la mise en pratique de la culture pure d'une spore ou d'un individu nous a permis de résoudre les diverses questions critiques posées dans l'introduction de ce travail et que l'observation, même la plus minutieuse, avait été impuissante à élucider jusqu'ici.

A un point de vue plus général, notre étude démontre en outre que :

5. *Chez les végétaux dioïques envisagés, la division d'un même œuf fécondé fournit, en dernière analyse, des individus de sexe différent.*

Elle apporte ainsi à la solution de cette importante question de biologie générale, une sérieuse contribution.



ACADÉMIE ROYALE DE BELGIQUE

CLASSE DES SCIENCES

MÉMOIRES

COLLECTION IN-8°

DEUXIÈME SÉRIE

TOME 1^{er}



BRUXELLES

HAYEZ, IMPRIMEUR DES ACADÉMIES

Rue de Louvain, 112

1904-1906