

Profils méristématiques de séquoias géants (*Sequoiadendron giganteum* Buchholz) jeunes et âgés durant les stades de repos végétatif et de débourrement

Olivier MONTEUUIS

Résumé — Le contour des dômes méristématiques de séquoias géants (*Sequoiadendron giganteum* Buchholz) peut être décrit au moyen d'une régression curvilinéaire de la forme $y = ax^b$. Les profils méristématiques obtenus sont significativement influencés par l'âge des sujets et le stade végétatif des bourgeons d'où sont issus les méristèmes. Par rapport aux observations correspondant au repos végétatif, les méristèmes prélevés lors du débourrement présentent une plus grande analogie morphologique avec le type juvénile évasé caractéristique. Ces résultats sont exposés en relation avec l'aptitude à la multiplication végétative du matériel considéré.

Apical meristem outlines of young and mature giant sequoias (*Sequoiadendron giganteum* Buchholz) during rest phase and budbreak

Abstract — Apical meristem outlines of giant sequoias (*Sequoiadendron giganteum* Buchholz) could be described through a curvilinear regression of the following form: $y = ax^b$. The profiles obtained were connected both to the age of the donor tree and to the phenology of the buds from which the apices were excised. Thus, when compared to the rest period, meristems removed during budbreak showed a larger basal surface, tending in this way to the juvenile characteristics. These results were considered in relation to the cloning capacities of the ortets.

Abridged English Version — In the same way as for a lot of ligneous species [1], success of *in vitro* meristem cultures of giant sequoia (*Sequoiadendron giganteum*) depends on the age of the donor tree and on the time of the explant removal [2]. The influence of these two factors on the apical meristem conformation was analysed, referring to 18 month-old and 100 year-old giant sequoia [3] during rest phase and budbreak. Random samplings of shoot apices collected at these periods from clones corresponding to these materials [3] were fixed then prepared according to standard histological procedures required for microscopic observations [4]. 30 median longitudinal apex sections, 7 μm thick, stained with Azure B [4], were examined for each of the 4 age \times vegetative state combinations. Every apical dome outline observed through the microscope was reported in an orthonormal (Ox, Oy) axis system — y -axis and the origin O corresponding respectively to the central longitudinal axis of the shoot apex and to its summit — to be experimentally defined by (x_i, y_i) coordinates.

As suggested by Schüepp [5], computer data processing established that the profiles observed could be reliably $-0.96 < R^2 < 1$, [6] — described by a curvilinear regression of the form: $y = ax^b$.

A two-way analysis of variance [6] pointed out significant influences — $p < 0.001$ — of the age and of the vegetative state of the plant material on the coefficient a , the exponent b and the product $a \cdot b$, which defined each profile; moreover, a noticeable interaction — $p < 0.001$ — of the two experimental factors was noticed for a and $a \cdot b$. Statistical analysis results are detailed in Table.

The profiles characterizing each of the 4 apex samples are drawn in Figure 1, and correspond to the following regressions:

- juvenile clone, rest phase (Fig. 1 a): $y = 0.41 x^{1.60}$ ($R^2 = 1$);
- juvenile clone, budbreak (Fig. 1 b): $y = 0.41 x^{1.34}$ ($R^2 = 0.99$);

Note présentée par Alexis MOYSE.

- mature clone, rest phase (Fig. 1 c): $y = 0.57 x^{1.80}$ ($R^2 = 1$);
- mature clone, budbreak (Fig. 1 d): $y = 0.46 x^{1.51}$ ($R^2 = 0.99$).

The analytic model adopted appeared to be the most satisfactory among the other regression forms tested to express, through a concise mathematic formulation, the conformation of vegetative shoot apices of giant sequoias.

The realistic profiles thus obtained showed that meristems from young trees were characterized by a large basal surface, by contrast with those from mature trees, which appeared to be sharper and narrower, as illustrated in Figure 2. These observations are in accordance with similar studies referring to other coniferous species ([7], [8], [9]) and considering the ratio of the height on the diameter measurements of the apical dome, with the smaller values corresponding to the more juvenile forms.

The other main feature of our study was the influence of the vegetative state of the bud on the relevant apex morphology ([10], [11], [12]). In agreement with Owston on *Pinus strobus* [8], it was found that meristems of giant sequoia at the budbreak time enlarged by comparison with the rest phase conformation, and thus tended to have the profiles associated with the juvenile forms which provided the best result in *in vitro* cultures [2]. This phenomenon, which was particularly noticeable for mature trees, suggest to consider the evolutionary aspects of apical meristems during the year, in relation to seasonal variations. Moreover, keeping in mind the relationship between the morphological aspects and the organogenic capacities [2], meristem conformation could reflect inner basic characteristics depending on the age of the plant and on its vegetative state. Relevant cytomorphological analysis taking into account these two factors are underway, and would give soon complementary information to verify this hypothesis.

Nevertheless, from now on, the results presently reported appear to be helpful to select the most promising explants for the success of *in vitro* meristem culture.

INTRODUCTION. — En dépit de nombreux succès dans le domaine horticole, la culture *in vitro* de méristèmes de certaines espèces arborescentes à des fins de clonage demeure aléatoire [1]. Sur *Sequoiadendron giganteum* Buchholz, nous avons pu constater que l'influence du végétal s'exerce principalement à travers son âge et l'état physiologique des explants au moment du prélèvement, les meilleurs résultats étant obtenus *in vitro* à partir de méristèmes excisés de bourgeons de jeunes individus en train de débourrer [2]. Ces remarques nous ont incités à tenter de caractériser de la façon la plus simple et immédiate possible les échantillons de méristèmes de séquoia géant observés en culture *in vitro* en fonction de leur origine. L'analyse de contours de dômes méristématiques d'individus jeunes et âgés durant les stades phénologiques bien distincts de repos végétatif et de débourrement a été entreprise dans cette optique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Origine des échantillons.* — Le matériel jeune, issu du bouturage d'un semis de séquoia géant âgé de 18 mois, peut être propagé par culture de méristèmes beaucoup plus facilement que le matériel âgé, provenant d'un séquoia géant centenaire greffé [2]. Ces pieds-mères, obtenus 3 ans auparavant [3] et cultivés depuis lors à l'extérieur, à l'Université de Clermont-Ferrand, présentent un port buissonnant diffus favorisé par des prélèvements fréquents. Ces plants sont représentatifs des deux classes d'âges considérées ([2], [3]). Les méristèmes primaires caulinaires observés proviennent d'extrémités d'axes végétatifs récoltés de façon aléatoire durant le repos végétatif de janvier, puis début mai, lors du débourrement.

Préparation des échantillons. — Les extrémités caulinaires débarrassées de la quasi-totalité de leurs formations foliaires sont fixées dans le mélange éthanol 95%/formaldéhyde/acide acétique (17/2/1; v/v/v), puis déshydratées par une série d'alcool-toluène [4] avant inclusion dans la paraffine. Les coupes longitudinales de 7 μ m d'épaisseur observées en microscopie optique ont été colorées par l'Azur B [4], en prévision d'analyses complémentaires ultérieures.

TABLEAU

Analyses de variance appliquées au coefficient a ,
à l'exposant b et au produit $a.b$ (Plan d'ordre 2 à 30 répétitions).
*Analysis of variance related to the coefficient a ,
the exponent b and the product $a.b$ (2^2 factorial design with 30 replicates).*

Origine	Paramètre considéré	Somme des carrés	Degré de liberté (d.d.l.)	Variance	Rapport de variances F
Entre stades végétatifs (repos ou débourrement)	a	0,104 2	1	0,104 2	12,40
	b	1,623 1	1	1,623 1	29,24
	$a.b$	1,324 4	1	1,324 4	69,71
Entre clones (jeune ou âgé)	a	0,278 0	1	0,278 0	33,10
	b	1,202 3	1	1,202 3	21,66
	$a.b$	1,914 7	1	1,914 7	100,77
Interaction	a	0,111 9	1	0,111 9	13,32
	b	0,014 3	1	0,014 3	0,25
	$a.b$	0,440 3	1	0,440 3	23,17
Résiduelle (directe)	a	0,976 4	116	0,008 4	—
	b	6,437 7	116	0,055 5	—
	$a.b$	2,209 4	116	0,019 0	—
TOTAL	a	1,470 5	119	—	—
	b	9,277 4	119	—	—
	$a.b$	5,888 8	119	—	—

Méthodes d'analyse, mesures et traitement des données. — La section la plus médiane de chaque méristème, débité longitudinalement en ruban de coupes, est choisie pour reporter au moyen d'une chambre claire le contour du dôme méristématique sur une feuille de papier, en précisant l'échelle. 30 tracés pour chaque combinaison : âge du clone (jeune ou âgé) \times stade végétatif (repos ou débourrement), soit au total 120 figures, ont été analysés.

Des observations réalisées tant dans l'espace qu'à partir de coupes longitudinales et transversales, tendent à assimiler la configuration des dômes méristématiques des points végétatifs caulinaires de séquoia géant, comme pour d'autres végétaux [5], à des paraboloides elliptiques de révolution. Le contour de chacun des méristèmes observés peut ainsi être caractérisé en projection plane à partir d'un ensemble de coordonnées cartésiennes (x_i, y_i) déterminées graphiquement dans un quadrant d'un repère orthonormé (Ox, Oy) , l'origine O et l'axe y des ordonnées correspondant respectivement au sommet et à l'axe central longitudinal du méristème considéré, comme il est indiqué dans la figure 1. Le traitement informatique des données obtenues semble indiquer que chaque relevé peut être décrit par une régression curvillinéaire de type puissance, de la forme $y = ax^b$, le coefficient de détermination R^2 renseignant sur la qualité de l'ajustement établi. Sur ces bases, les effets de l'âge du clone et du stade végétatif ont été analysés à travers le coefficient a , l'exposant b , et le produit $a.b$, au moyen d'analyses de variance à deux critères de classification appliquées à l'expérience factorielle 2^2 (plan d'ordre 2 à 30 répétitions) d'ensemble [6]. Une illustration synthétique de ces résultats sous forme d'un profil type de chacun des quatre échantillons de méristèmes considérés est proposée à partir des valeurs moyennes des couples (x_i, y_i) correspondant au 30 contours; le tracé intégral est obtenu par symétrie par rapport à l'axe Oy de l'ajustement établi pour le demi-axe Ox .

RÉSULTATS. — L'examen de l'ensemble des régressions effectuées pour les 120 cas de figures confirme que x et y sont liés de façon très satisfaisante par une relation de la forme $y = ax^b$, R^2 variant de 0,96 à 1.

Les différentes analyses de variance résumées dans le tableau révèlent un effet hautement significatif ($p < 0,001$) des facteurs : âge du clone et stade végétatif, sur les valeurs de a , de b , et de $a.b$, caractérisant chaque contour méristématique. L'influence de l'interaction entre les deux facteurs expérimentaux considérés se ressent très nettement sur le coefficient a et le produit $a.b$ ($p < 0,001$).

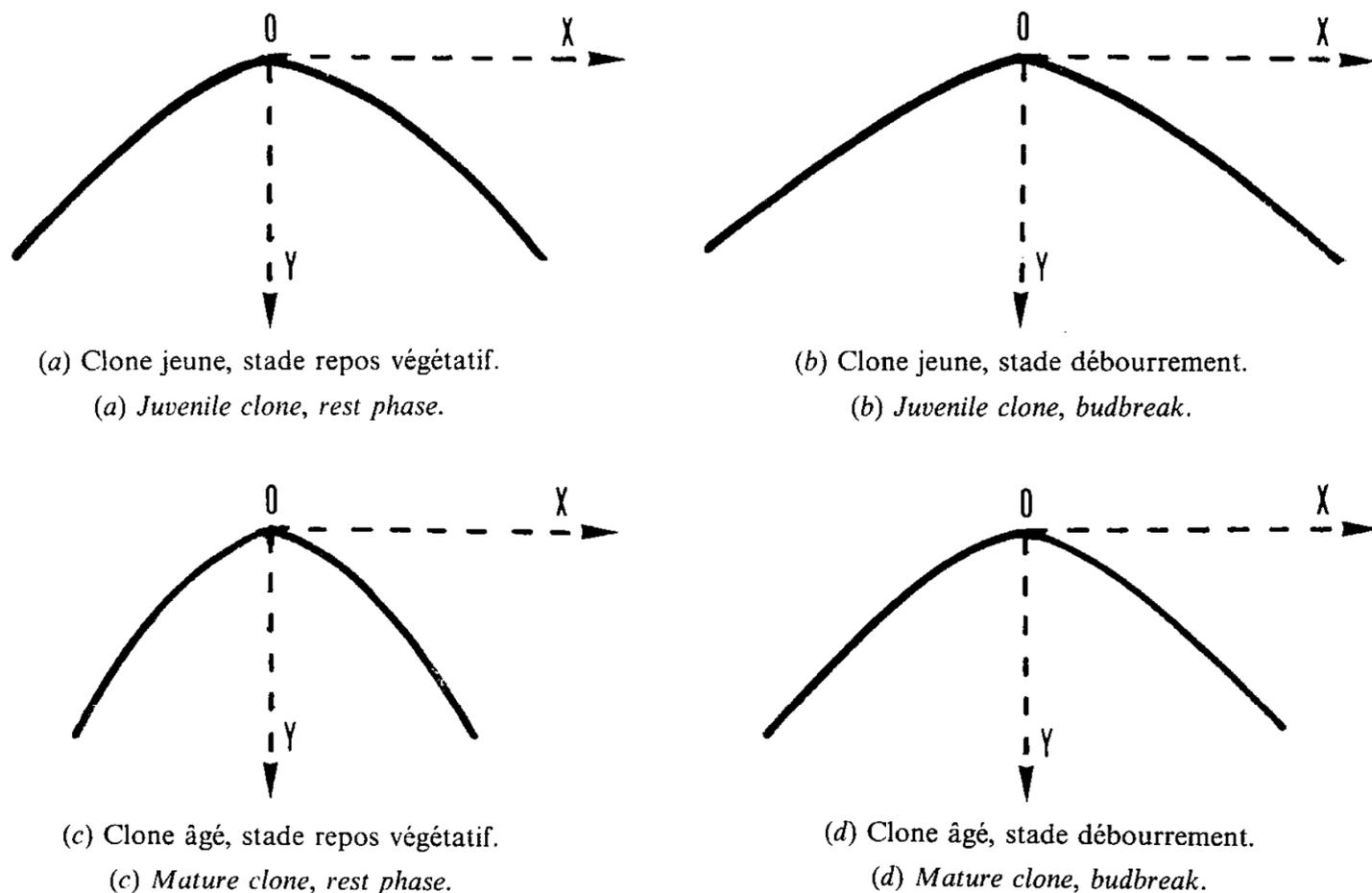


Fig. 1. — Profils caractéristiques de chacun des quatre échantillons de méristèmes étudiés ($G \times 570$)

Fig. 1. — Characteristic outlines of the apical domes corresponding to the four different origins observed ($M \times 570$).

Les profils caractéristiques de chacun des quatre échantillons de méristèmes étudiés sont regroupés au sein de la figure 1. Les tracés présentés ont été réalisés à partir des régressions suivantes ($x \geq 0$) :

- clone jeune, stade repos végétatif (fig. 1 a) : $y = 0,41 x^{1,60}$ ($R^2 = 1$);
- clone jeune, stade débourrement (fig. 1 b) : $y = 0,41 x^{1,34}$ ($R^2 = 0,99$);
- clone âgé, stade repos végétatif (fig. 1 c) : $y = 0,57 x^{1,80}$ ($R^2 = 1$);
- clone âgé, stade débourrement (fig. 1 d) : $y = 0,46 x^{1,51}$ ($R^2 = 0,99$).

DISCUSSION. — Le choix de la fonction $y = ax^b$ pour caractériser les profils méristématiques de séquoia géant étudiés s'explique par l'intensité de la liaison tout à fait satisfaisante entre les variables x et y , comme l'illustrent les valeurs de R^2 obtenues; en outre, cette relation séduit par sa formulation concise par rapport à d'autres types de régression éprouvés qui n'ont pas permis d'améliorer la qualité de l'ajustement. La méthodologie employée, à travers le modèle analytique retenu, traduit de façon claire et réaliste la conformation des extrémités apicales des points végétatifs, en relation avec la morphogénèse, sans sous-estimer la variabilité intra-échantillon illustrée par la variance résiduelle.

Comme pour *Picea abies* [7], les dômes méristématiques évasés, reposant sur une grande surface basale, semblent refléter un certain état juvénile (fig. 2), qui s'exprime notamment par une bonne aptitude à la multiplication végétative, en rapport avec une morphologie foliaire bien développée [3]. En revanche, les contours méristématiques plus pointus correspondent aux formes âgées, caractérisées entre autres, par des feuilles très réduites et une inaptitude au clonage ([2], [3]). Ces résultats concordent avec les observations réalisées sur *Pinus strobus* [8] et *Pinus ponderosa* [9], en considérant le rapport des

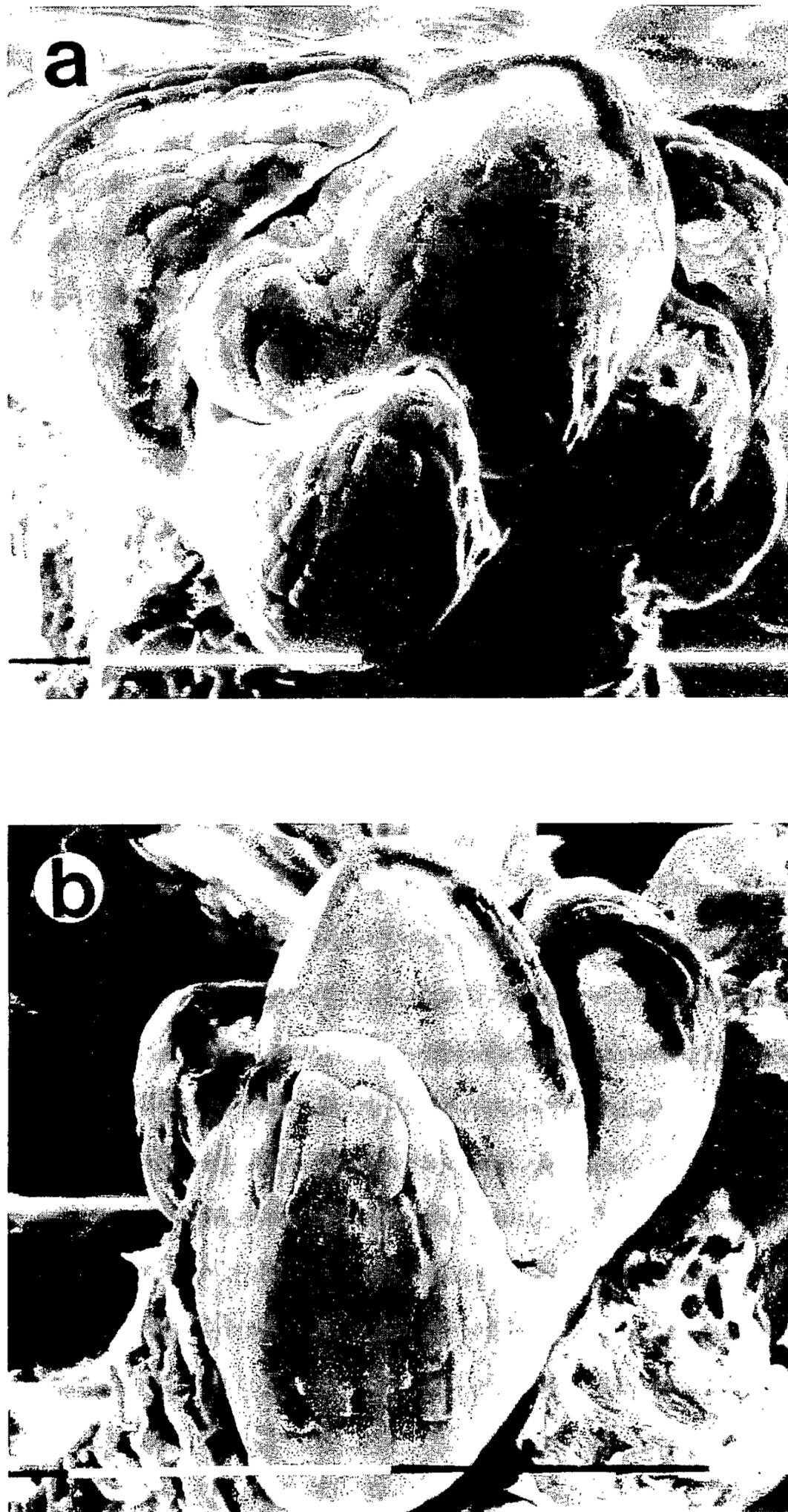


Fig. 2. — Méristèmes apicaux caulinaires de *Sequoiadendron giganteum* observés durant le repos végétatif. Le dôme méristématique du clone juvénile (a) est plus évasé que pour le clone âgé (b); échelle : 100 μ m.

Fig. 2. — Shoot apical meristems of *Sequoiadendron giganteum* observed during rest phase. The apical dome of the juvenile clone (a) looks wider than the mature clone one (b); scale bar: 100 μ m.

mesures de la hauteur et du diamètre des méristèmes prélevés sur des individus jeunes et âgés.

Par ailleurs, l'évolution des profils méristématiques en fonction de la phénologie des bourgeons ([10], [11], [12]), présentement mise en évidence pour des stades végétatifs bien distincts, incite à considérer l'aspect évolutif de certaines caractéristiques méristématiques, dont la forme ne pourrait être qu'un indice [10], et qui seraient influencées par des paramètres saisonniers. Conformément aux observations de Owston sur *Pinus strobus* [8], les méristèmes de séquoia géant ont tendance à sévasser au stade débourrement, évoluant par là même vers le profil méristématique caractéristique des formes juvéniles. Ce phénomène est particulièrement important pour les méristèmes de séquoias géants âgés, dont les différences avec leurs homologues issus de jeunes sujets ont tendance à s'atténuer au moment du débourrement, notamment en ce qui concerne leur réactivité en culture *in vitro* très nettement supérieure à l'ordinaire [2].

Des investigations en cours devraient fournir très prochainement des informations complémentaires, sur le plan cytologique, aux observations morphologiques exposées qui permettent, dès à présent, de choisir lors de la mise en culture les méristèmes les plus prometteurs en vue du clonage.

Je tiens à remercier M^{me} Genestier du Laboratoire de Phytomorphogenèse de l'Université de Clermont-II pour sa participation efficace à la préparation des échantillons, ainsi que M^{me} Says-Lesage d'une part et MM. Lacoïnte et Martignac d'autre part de l'I.N.R.A. de Crouelle, respectivement pour les clichés en microscopie électronique à balayage et le traitement statistique des données.

Note reçue le 12 octobre 1987, acceptée le 28 octobre 1987.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. L. MOTT, *Trees*, dans *Cloning agricultural plants via in vitro techniques*, B. V. CONGER éd., C.R.C. Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1981, p. 217-247.
- [2] O. MONTEUUIS, *Tree Physiology* (sous presse).
- [3] O. MONTEUUIS, *Annales AFOCEL* 1984, 1985, p. 139-171.
- [4] W. A. JENSEN, *Botanical histochemistry: principles and practice*, Freeman and Co., San Francisco, 1962, 408 p.
- [5] O. SCHÜEPP, *Meristeme*, Berkhaüser Verlag, Basel et Stuttgart, 1966, 253 p.
- [6] G. W. SNEDECOR et W. G. COCHRAN, *Méthodes statistiques*, ACTA, 1957, 649 p.
- [7] R. A. GREGORY et J. A. ROMBERGER, *Amer. J. Bot.*, 59, 1972, p. 587-597.
- [8] P. W. OWSTON, *Can. J. Bot.*, 47, 1969, p. 1181-1188.
- [9] H. B. TEPPER, *Amer. J. Bot.*, 50, 1963, p. 589-596.
- [10] E. M. GIFFORD et G. E. CORSON, *Bot. Rev.*, 37, 1971, p. 143-229.
- [11] J. N. OWENS et M. MOLDER, *Can. J. Bot.*, 51, 1973, p. 2223-2231.
- [12] R. V. PARKE, *Amer. J. Bot.*, 46, 1959, p. 110-118.

Laboratoire de Phytomorphogenèse, U.A. n° 45, C.N.R.S., 4, rue Ledru, 63038 Clermont-Ferrand Cedex.
et Association Forêt-Cellulose, domaine de l'Étançon, 77370 Nangis.