

L'HYPOLLUMINATION : UNE TECHNIQUE D'OBSERVATION DE MERISTEMES APICAUX D'ARBRES FORESTIERS

Guy ROUSSEL

INRA

Laboratoire de génétique et d'amélioration
des arbres forestiers
PIERROTON 33610 CESTAS

1. INTRODUCTION

La croissance en hauteur des arbres forestiers résulte de deux processus: l'initiation d'entre-noeuds dans un bourgeon et leur allongement l'année suivante. Des travaux antérieurs ont montré que l'initiation contribue pour une part plus importante dans les potentialités de croissance que l'élongation: chez le pin maritime, la croissance en hauteur une année donnée dépend plus du nombre d'entre-noeuds présents dans le bourgeon que de leur longueur moyenne. Ces résultats nous ont conduit à étudier plus en détail le fonctionnement du méristème apical, à savoir le rythme, la durée et le taux d'activité. Il fallait donc mettre au point une technique rapide et fiable d'observation des méristèmes apicaux permettant de mesurer ces paramètres.

2. CONTRAINTES EXPERIMENTALES

L'observation des méristèmes apicaux doit fournir les informations suivantes :

- mesures des caractéristiques dimensionnelles du dôme apical et des derniers primordia formés (primordia :(fig 1) pluriel de primordium, forme embryonnaire au niveau du méristème qui en se développant donnera écorce, feuille, rameau, inflorescence).
- identification des arrangements phyllotaxiques (fig.2), qui doit permettre de numéroter les primordia selon l'ordre de leur formation.

Ces renseignements doivent être relevés sur une vue horizontale du méristème. Le relevé de caractéristiques dimensionnelles requiert l'observation des méristèmes en milieu liquide, évitant tout retrait lié à un dessèchement. L'identification des arrangements phyllotaxiques nécessite le maintien autour du dôme apical de l'empreinte d'une vingtaine de primordia. Ces primordia sont bien évidemment situés à des niveaux différents, sur un axe vertical. Il faut trouver une technique préservant une profondeur de champ suffisamment grande pour observer simultanément le dôme apical et les vingt empreintes des primordia foliaires.

Fig 1 Partie terminale d'un
bourgeon de pin dépouillé
de ses écailles protectrices
Photo prise au microscope
électronique à balayage

Dôme apical _____

Primordium _____

Empreinte restant après
cassure d'un primordium qui
recouvrait le dôme apical.

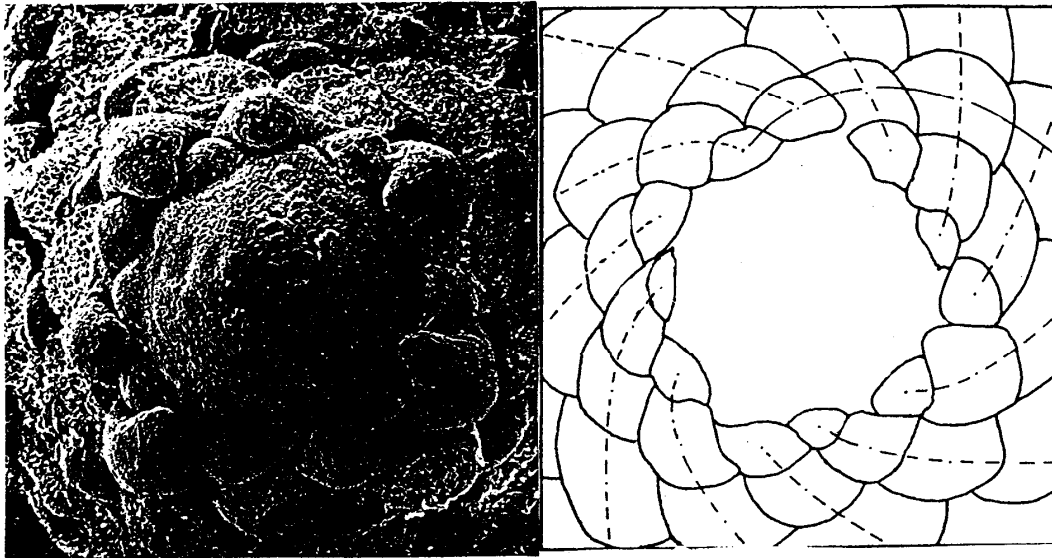
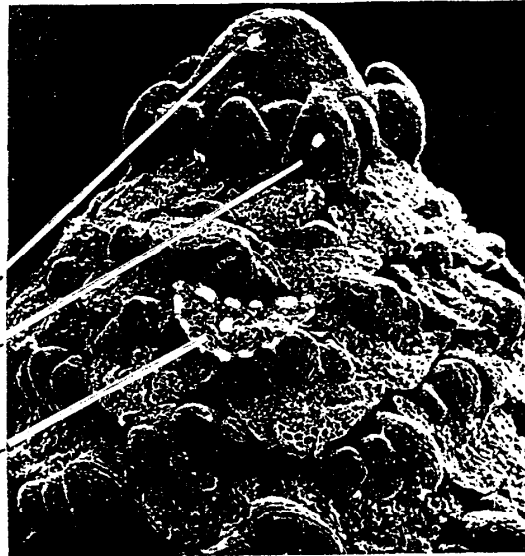


Fig 2 Vue horizontale du méristème apical prise au microscope
électronique à balayage. Représentation schématique des
arrangements phyllotaxiques.

3. MATERIEL NECESSAIRE

Neuf cent observations ont été réalisées pour une étude citée en bibliographie. Le coût d'une telle opération en microscopie électronique à balayage eût été prohibitif. La microscopie optique avec les techniques d'inclusion dans la paraffine et de tranchage est lourde et inadaptée. Elle ne permet pas d'obtenir une profondeur de champ suffisante. La stéréoscopie adaptée par quelques montages simples donne des résultats très satisfaisants. Le matériel de base comprend un stéréoscope sur pied surélevé et possédant un diaphragme, une fibre optique de 100 watts. Quelques adaptations particulières sont cependant nécessaires.

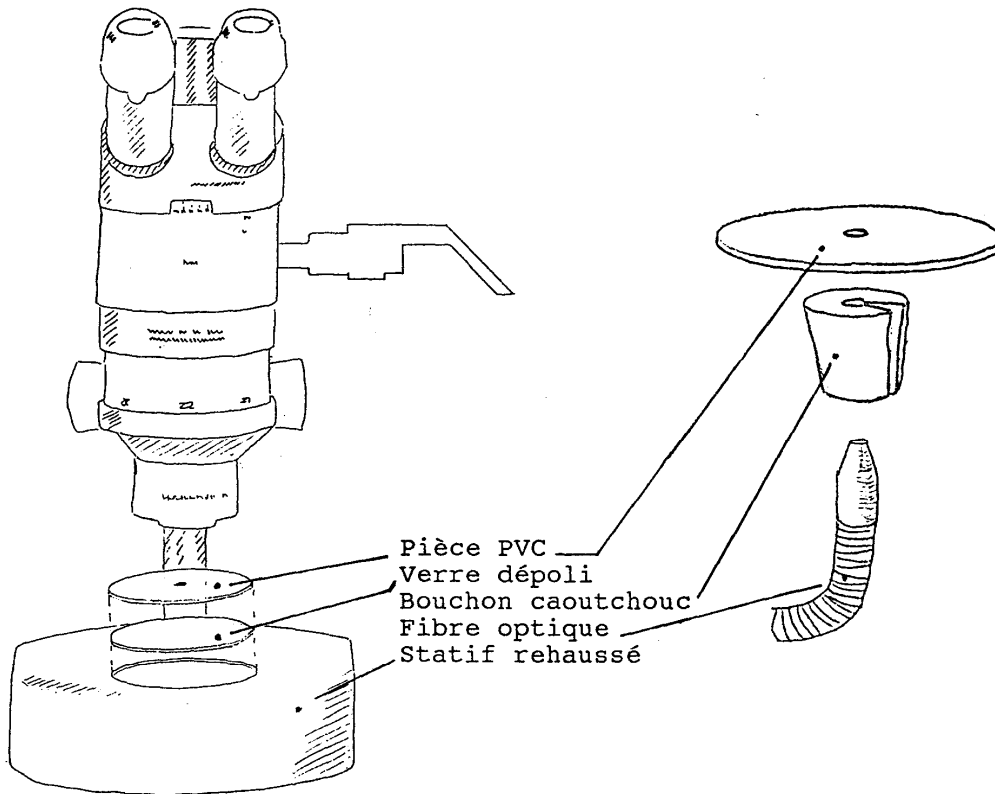


Fig 3 Description du matériel de base

Fig 4 Dispositif de blocage de la fibre optique

- On découpe une pièce PVC aux dimensions du verre dépoli du statif de la loupe binoculaire. Cette pièce est percée en son centre au diamètre de la fibre optique (fig 3).
- A l'aide d'un bouchon de caoutchouc percé et entaillé latéralement ensuite collé sur la pièce PVC décrite ci-dessus, la fibre optique est maintenue en position verticale dans le statif (fig.4). On obtient un flux lumineux puissant directement dans le trajet optique de la binoculaire.

Evidemment l'opérateur ne peut supporter ce violent éclairage. Il est nécessaire à ce stade de protéger l'opérateur et de maintenir la coupe en position horizontale en milieu liquide.

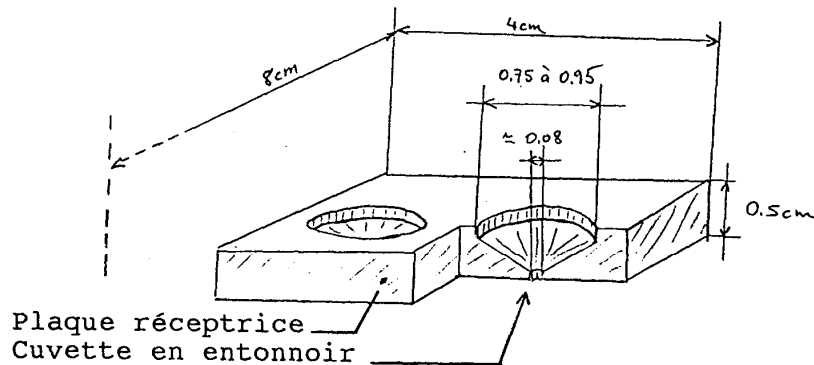


Fig 5 Schéma de la plaque réceptrice

- Pour cela nous réalisons une plaque en PVC opaque percée de petites cuvettes réceptrices des méristèmes (plaque réceptrice). Ces cuvettes sont percées en deux étapes. Le premier perçage est réalisé au diamètre le plus faible, le second au grand diamètre sans perforation complète de la plaque. Des cuvettes de tailles différentes sont percées dans la plaque de manière à pouvoir recevoir des méristèmes de taille variable. Les côtes utilisées pour la plaque et les cuvettes peuvent être adaptées à d'autres types de manipulation (fig.5). Le faible diamètre laisse passer la lumière nécessaire à l'illumination de l'objet observé, de manière à le voir par transparence. L'objet masque cet orifice, il n'y a donc plus d'aveuglement. La forme en entonnoir de la cuvette permet de positionner l'objet pour améliorer son horizontalité (fig 6). La plaque à cuvettes est immergée dans le liquide de fixation, dans une boîte de Petri.

4. LIQUIDE DE FIXATION ET D'OBSERVATION

Bien que le FAA (formol, alcool, acide acétique) soit le plus souvent recommandé dans les ouvrages d'anatomie végétale, nous conseillons d'utiliser une solution de 70% d'éthanol pour des raisons de confort. Nous n'avons pas noté de modifications de qualité de conservation entre les deux liquides de fixation. L'intérêt de la conservation réside aussi dans le durcissement des tissus, notamment des écailles et des aiguilles primaires, facilitant ainsi grandement l'opération de dépouillement.

Nous avons vérifié qu'un stockage soit progressif dans des solutions graduelles d'alcool, soit directement dans une solution d'alcool à 70%, ainsi qu'un stockage prolongé dans ce liquide de fixation n'occasionnait pas de variations de la taille du méristème (retrait éventuel).

5. PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL A L'HYPOILLUMINATION

Le matériel végétal (bourgeon pour les arbres adultes ou rosette pour les jeunes plants) peut être récolté tout le long de l'année. Ce matériel est tout simplement immergé dans le liquide de fixation et stocké. Pour les gros bourgeons un dégazage avec une trompe à vide favorise la pénétration du fixateur. La dissection du bourgeon ou de la rosette se fait en deux stades :

- Dans un premier temps, les écailles (bourgeon) ou les feuilles primaires (rosette) sont détachées soigneusement de l'axe de la tige à l'aide d'une pince. Ceci pour dégager la partie apicale de la tige. Certaines espèces ne nécessitent pas un dépouillement aussi complexe (Abies). Cette opération se fait à l'oeil nu. Pour plus de précision on la termine à la loupe binoculaire.
- Ce dépouillement se poursuit jusqu'au niveau désiré: dans notre cas, seul les 10 derniers primordia sont gardés. Nous conseillons de garder suffisamment de longueur de tige (2cm), pour la suite de la manipulation.

6. OBSERVATION A LA BINOCULAIRE

Le méristème apical est coupé (épaisseur 2 à 5 mm) sur la tige restant à l'aide d'un scalpel. Nous déposons le méristème dans une des cuvettes de la plaque immergée dans la boîte de Petri (fig.7). En positionnant la cuvette dans l'axe de la fibre optique nous pouvons observer par transparence le méristème. Plusieurs problèmes peuvent se poser à ce stade de l'observation:

- La transparence n'est pas suffisante, voir le méristème peut être totalement opaque. On peut dans ce cas excaver le méristème en prélevant une partie de la moelle de la tige primaire (Fig.8). Ceci est possible surtout sur les bourgeon.
- La surface du dôme apicale n'est pas parfaitement horizontale on améliore l'assiette en jouant sur la position du méristème dans la cuvette, si nécessaire arranger la découpe.
- L'éblouissement par la fibre optique empêche toute observation. Dans ce cas, il faut changer de cuvette, au besoin en percer de nouvelles. Parfois la manipulation a altéré le matériel et il n'est plus observable.

Notre expérience a montré qu'il faut essayer de travailler rapidement. En effet l'échauffement du liquide peut entraîner des courants de convection dans la cuvette, pouvant occasionner un retournement du méristème. Le diaphragme de la binoculaire est très utile pour doser l'intensité de la luminosité, surtout lors du dessin à la chambre claire. L'usage montre que cette technique permet des observations très fines et précises (Fig.9 A). Elle est basée sur les différences de transparence des tissus de la tige. On peut accentuer les contrastes par une coloration à la safranine. Les coupes sont colorées dans une solution concentrée. Le lavage dans le liquide de fixation permet de doser les contrastes.

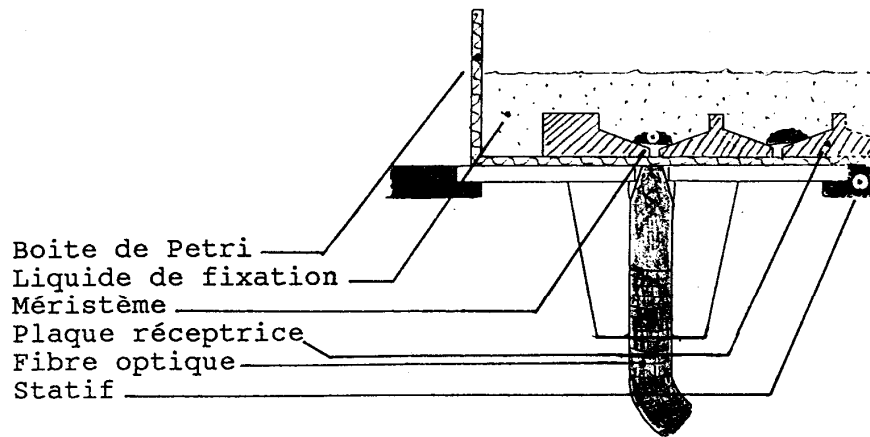


Fig 6 Description générale du dispositif d'observation

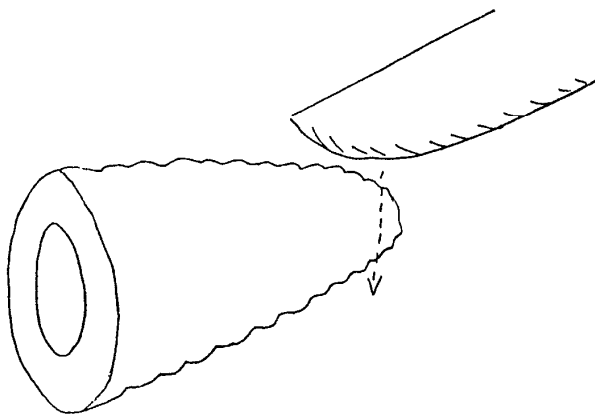


Fig 7 Découpe du méristème

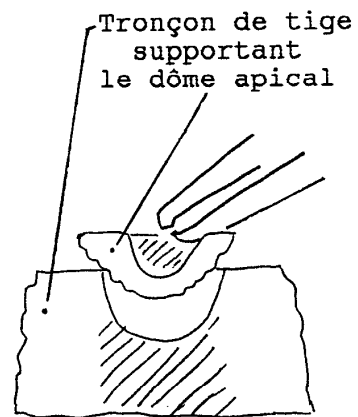


Fig 8 Excavation du méristème pour améliorer la transparence

7. UTILISATION DE LA TECHNIQUE

Dans notre laboratoire cette technique d'hypoillumination a permis de mener jusqu'au niveau du méristème l'observation et la mesure de paramètres de l'initiation et du développement de la croissance en hauteur sur de nombreux échantillons, cela durant toute la saison de végétation. Les données dimensionnelles du méristème et l'identification des arrangements phyllotaxiques sont obtenus à partir du dessin à la chambre claire (Fig.9 B). Les dessins sont exploités avec une table à numériser. L'intérêt principal de cette technique réside dans notre cas particulier dans l'estimation indirecte de la durée de plastochron (temps séparant l'initiation de deux primordia successifs), qui quantifie l'activité du méristème. En effet, les caractéristiques dimensionnelles du dôme apical et des primordia varient nettement selon l'intensité d'activité du méristème. Le recueil de ces données grâce à la technique d'hypoillumination permet donc de connaître, de manière instantanée, le niveau d'activité d'un méristème. Nous renvoyons aux articles cités ci-dessous pour ces aspects plus spécifiques. Cette technique peut très bien être appliquée à d'autres domaines (morphogenèse d'organes végétatifs ou reproducteurs), d'autres organes ou d'autres espèces.

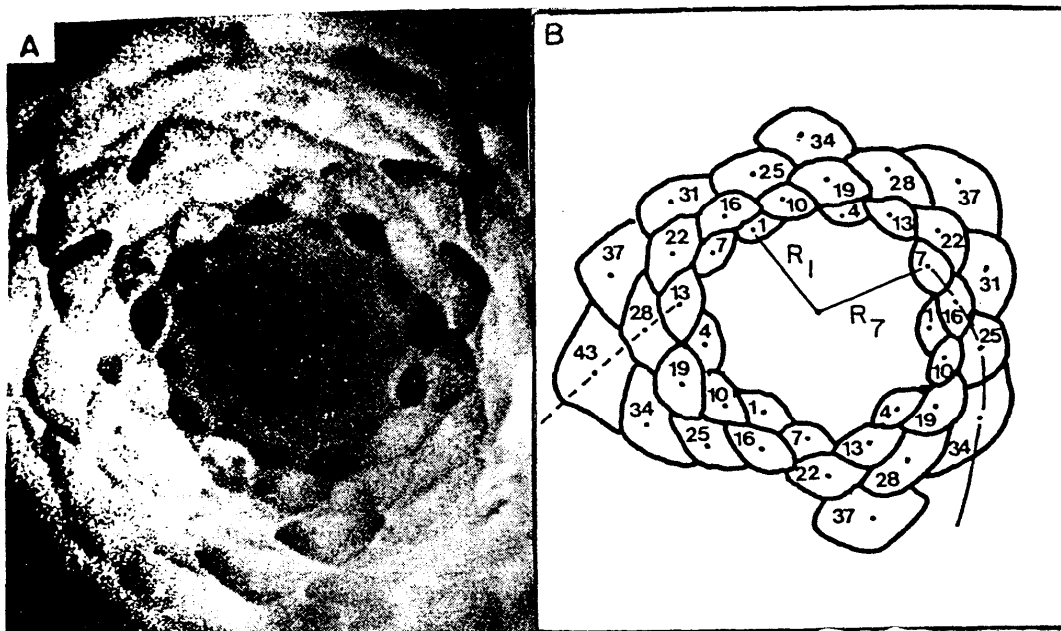


Fig 9 A Photographie horizontale d'un méristème apical de pin maritime (diamètre moyen 20 à 30 u), observé par hypoillumination
B Dessin réalisé à la chambre claire à partir de ce même méristème

8. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES AYANT FAIT APPEL A CETTE TECHNIQUE

A.KREMER, G.ROUSSEL 1986

Décomposition de la croissance en hauteur du pin maritime.

Variabilité des composantes morphogénétiques et phénologiques.

ANN-SCI.FOR. 43:15-34

A.KREMER, L.A XU 1989

Relationship between first season free growth components and later field height growth in maritime pine (Pinus Pinaster Ait.)

CANADIAN JOURNAL OF FOREST RESEARCH 19:690-699

A.KREMER, L-A XU, J.P.GUYON, G.ROUSSEL 1989

Genetic, age and ontogenetic variation of phyllotactic arrangements in pine species.

CANADIAN JOURNAL OF BOTANY 67:1254-1261

F.GROLLEAU

Etude de l'effet de la sécheresse sur la vitesse de formation des aiguilles chez de jeunes plants de pin maritime.

Rapport de stage IUT ANGERS , 25 pages

J.P.GUYON

Influence de la température et des précipitations sur l'activité du méristème apical dans une régénération naturelle de pin noir d'Autriche (Pinus Nigra Arn.ssp. nigricans Hist.)

ACTA OECOLOGIA