

## Summary

Microsporogenesis is described and illustrated in the male strobili of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) FRANCO from the premeiotic mother cell through microspore formation. A total of eight trees were examined cytologically, of which four represented the coastal and four represented the Intermountain race of Douglas-fir. Trees from both geographic regions showed a haploid chromosome number of 13. Similarly, both races exhibit three types of chromosomes according to the position of the centromere. Among the 13 chromosomes, five had median centromeres, six had sub-terminal centromeres, and two behaved as though the centromeres were terminal. In addition to primary constrictions, sometimes up to three secondary constrictions were observed which were always in association with metacentric chromosomes. The possible origin of the two telocentric chromosomes, unique to *P. menziesii*, is discussed.

## Literature Cited

BARNER, H., and CHRISTIANSEN, H.: The formation of pollen, the pollination mechanism, and the determination of the most favorable time for controlled pollination in *Pseudotsuga menziesii*. *Silvae Genet.* 11: 89-102 (1962). — CHRISTIANSEN, H.: On the chromosomes of *Pseudotsuga macrocarpa* and *Pseudotsuga menziesii*. *Silvae Genet.* 12: 125-127 (1963). — DARLINGTON, C. D.: *Misdivision and the genetics of the centromere*. *J. Genet.* 37: 341-364 (1939). — DARLINGTON, C. D., and LA COUR, L. F.: Hybridity selection in *Campanula*. *Heredity* 4: 217-248 (1950). — DARLINGTON, C. D.: *Chromosome botany*. George Allen and Unwin Ltd., London, 186 pp. (1956). — DURRIEUE-

VABRE, A.: Chromosomes de *Pseudotsuga douglasii* CARRIERE. *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)* 246: 3660-3663 (1958). — HAIR, J. B., and BEUZENBERG, E. J.: Chromosomal evolution in the Podocarpaceae. *Nature* 181: 1584-1586 (1958). — JOHN, B., and LEWIS, K. R.: The chromosome complement. *Protoplasmatologia*, vol. 6, 206 pp. (1968). — JONES, K., and COLDEN, C.: The telocentric complement of *Tradescantia micrantha*. *Chromosoma* 24: 135-157 (1968). — KAUFMANN, B. P.: Somatic mitoses of *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* 56: 125-155 (1934). — KHOSHOO, T. N.: Cytogenetical evolution in the gymnosperm karyotype. *Proc. Summer School of Botany* 119-135, Darjeeling, India (1960). — LANGLET, O.: Om Variationen hos tallen (*Pinus silvestris L.*) och dess samband med klimatet. *Svenska SkogsFör. Tidskr.* 32: 87-110 (1943). — LEWIS, K. R., and JOHN, B.: *Chromosome marker*. Little, Brown and Co., Boston, 49 pp. (1963). — LEWITSKY, G. A.: The morphology of the chromosomes. *Bull. Appl. Bot.* 27: 19-173 (1931). — MARKS, G. E.: Telocentric chromosomes. *Amer. Nat.* 91: 223-232 (1957). — MCCLINTOCK, B.: The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. *Genetics* 23: 315-376 (1938). — MCCLINTOCK, B.: A correlation of ring-shaped chromosomes with variegation in *Zea mays*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 18: 677-681 (1932). — MUNZ, P. A., and KECK, D. D.: A California flora. Univ. Calif. Press, Berkeley, Calif., 1681 pp. (1959). — RHOADES, M. M.: Studies of a telocentric chromosome in maize with reference to the stability of its centromere. *Genetics* 25: 483-520 (1940). — SAX, K., and SAX, H. J.: Chromosome number and morphology in the conifers. *J. Arnold Arboretum* 14: 356-375 (1933). — SWANSON, C. P., MERZ, T., and YOUNG, W. J.: *Cytogenetics*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J., 194 pp. (1967). — THOMAS, G., and CHING, K. K.: A comparative karyotype analysis of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) FRANCO and *Pseudotsuga wilsoniana* (HAYATA). *Silvae Genet.* 17: 138-143 (1968). — ZENKE, U.: Untersuchungen über den Ablauf der Meiosis bei *Pseudotsuga taxifolia* BRITTON. *Zeitschr. Forstgenet.* 2: 96-102 (1953).

# Induction florale précoce chez *Cupressus arizonica* et *Chamaecyparis lawsoniana*

Action de l'acide gibberellique et d'autres substances de croissance

Par MARC BONNET-MASIMBERT<sup>1</sup>

Laboratoire de Physiologie Pluricellulaire, C.N.R.S.  
Gif-sur-Yvette — 91 —

## Introduction

La mise au point de méthodes permettant de provoquer une floraison précoce représenterait un outil de travail de première importance pour l'amélioration des arbres forestiers.

Depuis longtemps, les forestiers se sont attachés à résoudre ce problème, sans que pour l'instant une solution véritable ait pu être trouvée. La première solution a consisté à expérimenter un certain nombre de techniques déjà utilisées pour les plantes horticoles et les arbres fruitiers. MATTHEWS (1963), dans une étude sur les différents facteurs susceptibles d'intervenir dans la floraison des arbres forestiers, signale les techniques de taille des racines, d'anélation ou d'étranglement des tiges d'arcure des branches. Ces techniques permettent effectivement d'augmenter souvent l'intensité de la floraison, parfois aussi de gagner quelques années par rapport à l'âge normal d'apparition des premières fleurs. Ce gain de temps n'est cependant pas assez important pour que puissent être appliquées aux arbres forestiers les techniques classiques d'amélioration qui demandent un travail sur plusieurs générations. Aussi

MATTHEWS pense-t-il que le véritable progrès passe par une meilleure connaissance de la physiologie de la floraison, et, en particulier, par l'étude du rôle des substances de croissance susceptibles de pouvoir intervenir dans ce phénomène.

Or, dès 1958, des chercheurs japonais (KATO et al. 1958, 1960; HASHIZUME 1959-1963) signalaient la possibilité de provoquer la floraison de jeunes plants (2 ans) de divers Taxodiacées et Cupressacées par application d'acide gibberellique. En 1965 PHARIS et ses collaborateurs réussissaient à provoquer, par application d'acide gibberellique, la floraison de plants de *Cupressus arizonica* âgés seulement de 88 jours. Par la suite, PHARIS et al. (1967, 1969) ont pu préciser chez *Cupressus arizonica* et *Thuya plicata* dans quelles conditions climatiques pouvait s'effectuer cette induction. Ils ont notamment montré de quelle façon il était possible d'agir sur la proportion d'inflorescences mâles ou femelles en faisant varier les conditions photopériodiques.

Au cours du présent travail, nous avons essayé non seulement d'intensifier l'induction florale précoce, mais encore d'augmenter la production d'inflorescences femelles. Nous avons aussi suivi, notamment par une étude histologique, l'effet de la photopériode sur la maturation des inflorescences produites.

<sup>1</sup> Adresse actuelle: Station d'Amélioration des Arbres Forestiers (I.N.R.A.), Champenoux 54 — Einville.

## Matériel et Technique

Tous les plants ont été obtenus à partir de graines fournies par la Station d'Amélioration des Arbres Forestiers de Nancy (I.N.R.A.). Le semis a été effectué sur mélange de tourbe et gravier recouvert de «Vermiculite». Par la suite, les plants ont été repiqués en godets individuels sur de la fibre de verre recouverte de «Vermiculite» et arrosés automatiquement avec la solution nutritive mise au point pour le Phytotron de Gif (NIRSCH, 1965). Les conditions sont celles des «Superserres» du Phytotron de Gif-sur-Yvette. Il s'agit de serres à éclairage naturel avec possibilité d'établissement de jours longs de 16 h (JL) par apport de lumière artificielle (1500 lux), ou création de jours courts de 10 h (JC) par obscurcissement complet au moyen de rideaux. Les températures sont de 24° C de 8 h à 18 h et de 17° C de 18 h à 8 h.

Entre octobre 1967 et novembre 1969, nous avons procédé à de nombreux essais sur des plants d'âges divers. Les applications de substances de croissance ont été faites par pulvérisation jusqu'à gouttes tombantes de solutions aqueuses en présence de 10 g/l de «Tween 80» comme mouillant.

Les résultats des expériences sont présentés sous forme de tableaux dans lesquels l'intensité des réactions est représentée par un plus ou moins grand nombre de croix. Les comparaisons ne peuvent se faire qu'à l'intérieur d'une même expérience.

Pour les études histologiques, le matériel a été fixé par le mélange formol (5)-acide acétique (5)-éthanol à 70% (90), puis inclus dans la paraffine avant d'être coloré à la safranine et au «fast green».

## Résultats Expérimentaux

### I — Expérience préliminaire

Dans un premier essai, nous avons étudié les réactions à la photopériode de jeunes plants âgés de 3 mois, de *Cupressus arizonica*, *Cupressus sempervirens*, *Chamaecyparis lawsoniana*, *Picea excelsa*, *Picea sitchensis* et *Pinus densiflora*. Pour chaque espèce, nous disposions de 4 lots homogènes de 10 plants. Un lot était placé en régime de JC de 10 h, un autre en JL de 16 h, un autre enfin en JC de 10 h avec nuit interrompue en son milieu par 1 h de lumière rouge. NITSCH (1957) et NITSCH et SOMOGYI (1958) signalent que ce dernier traitement produit sur la croissance des effets analogues aux JL. Un dernier lot, recevant des JL de 16 h a reçu (1 fois par semaine) pendant 8 semaines une pulvérisation d'acide gibbérellique (100 mg/l).

**Effet de la photopériode.** — La croissance de *Cupressus arizonica* et *Chamaecyparis lawsoniana* n'a pas accusé de différence significative entre le traitement JC et le traitement JC + nuit interrompue. Toutes les autres espèces se sont arrêtées en JC mais ont continué à croître en JC + nuit interrompue. Les figures 1, 2 et 3 montrent ces deux types de réaction.

**Effet de l'acide gibbérellique.** — L'effet le plus général de l'AG a été un renforcement de la dominance apicale puisque, chez toutes les espèces étudiées, les ramifications latérales ont été beaucoup moins nombreuses dans la série JL + AG que dans la série JL (voir fig. 1 b et 2 b). C'est là une propriété fréquemment remarquée de l'AG (PHARIS et al. 1965 b; TRONCHET et al. 1964). La croissance en hauteur est stimulée au moment du traitement, sauf dans le cas des *Picea* et *Pinus* étudiés, où l'AG a, au contraire, inhibé la croissance en hauteur. Chez *Picea excelsa*, nous avons même observé sur tous les plants traités par l'AG une in-

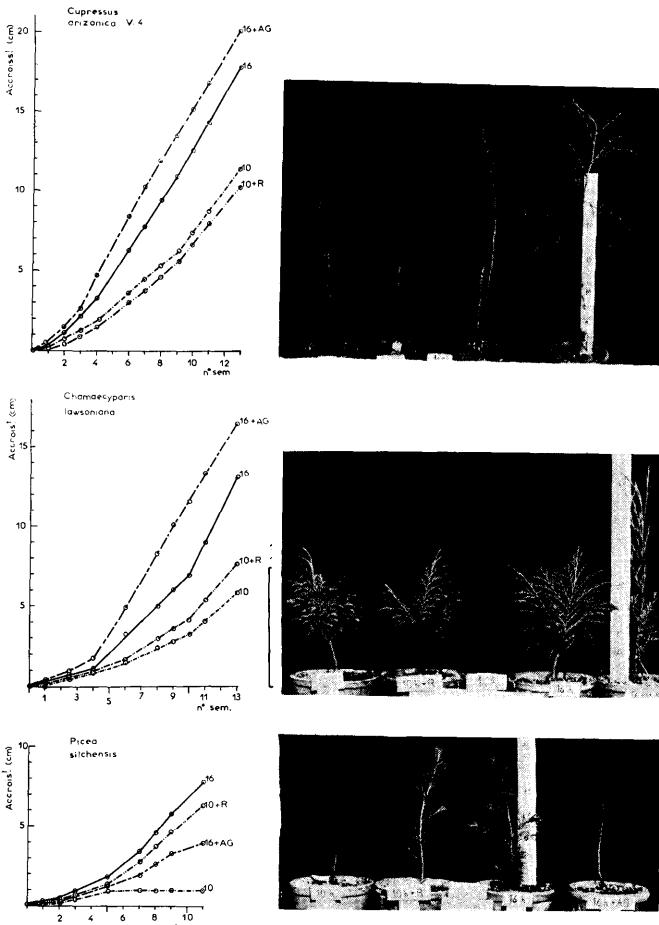


Fig. 1-3. — Effets de la photopériode et de l'acide gibbérellique sur la croissance de *Cupressus arizonica* (1), *Chamaecyparis lawsoniana* (2), *Picea sitchensis* (3). — a: Accroissement en longueur de la pousse terminale des plantes. b: Aspect des plantes après 14 semaines de traitement. (10 = JC de 10 h; 10 + R = JC de 10 h avec nuit interrompue en son milieu par 1 h de lumière fluorescente rouge; 16 = JL de 16 h; 16 + AG = JL de 16 h avec traitement par AG (100 mg/l) pendant les 8 premières semaines).

duction de dormance avec formation d'un gros bourgeon terminal.

D'autre part, après le traitement à l'AG, des inflorescences mâles sont apparues sur tous les plants de *Chamaecyparis lawsoniana* et sur la moitié des *Cupressus arizonica*. Cette floraison s'est manifestée 14 semaines après le début des traitements, sur des plants qui avaient alors seulement 7 mois (fig. 4 et 5). Chez *Cupressus arizonica*, nous avons obtenu du pollen, alors que chez *Chamaecyparis lawsoniana*, il n'y a pas eu maturation du pollen, et cela même après 4 mois en JL. Au contraire, il s'est produit alors de nombreuses réversions végétatives (fig. 5 e).

Nous avons constaté chez *Cupressus arizonica* une certaine toxicité due au traitement par l'AG, qui s'est traduite par une teinte plus claire, voire un jaunissement, de l'ensemble du plant et par un certain nombre de nécroses des parties terminales des rameaux.

### II — Action de l'acide gibbérellique seul

***Cupressus arizonica*.** — Lors du premier essai, nous avions répété le traitement 8 fois avec une seule concentration d'AG (100 mg/l). Nous avons voulu déterminer le seuil de concentration permettant la floraison et la concentration conduisant à une floraison importante sans mani-



Fig. 4. — Floraison précoce de *Cupressus arizonica* âgés de 7 mois après 8 traitements à l'AG (100 mg/l) — a: vue d'ensemble d'un plant; b: détail de deux cônes mâles. Noter que les plants ont conservés leur feuillage juvénile.

festations de toxicité. Les traitements exposés dans le Tableau I concernent des lots de 10 plantes âgées de 8 mois au début de l'essai.

Les résultats du Tableau I montrent, la très grande sensibilité de *Cupressus arizonica* à l'AG, puisque même une concentration de 1 mg/l est capable de provoquer une floraison mâle sur 90% des plants. Cependant, la plus forte floraison correspond au maximum de traitements (5) avec la plus forte concentration en AG. Le seul traitement qui ait permis une forte floraison sans toxicité marquée correspond à 2 traitements à la concentration de 100 mg/l.

Tableau I. — Effet de diverses concentrations d'AG sur la croissance et la floraison mâle de *Cupressus arizonica*. — (a) Une application par semaine. — (b) En pourcentages de la série-témoin.

Conc. AG (mg/l)	Nombre d'applications (a)	Plants fleuris	Densité de floraison	Toxicité % plants	degré	Hauteur moyenne (b)
0	5	0 %	0	0	0	100 %
1	5	90 %	+	0	0	103
10	5	100 %	+++	80	+++	103
100	2	100 %	++	40	+	109
100	4	100 %	+++	100	+++	120
100	5	100 %	++++	100	+++	115

C'est dans cette série que sont apparues les premières inflorescences, 4 semaines seulement après le début des traitements. Or, nos observations portent sur des ébauches tout à fait visibles à l'oeil nu, ce qui implique une différenciation rapide de ces organes après les traitements.

Enfin, au moment de cette observation, nous ne savions pas reconnaître de façon précoce les inflorescences femelles. Il a fallu une étude histologique (fig. 6) pour distinguer par la suite ce type d'inflorescences.

Dans les essais qui ont suivi, nous avons adopté un traitement unique par l'AG à 50 mg/l, limitant ainsi les phénomènes de toxicité. En ne conduisant qu'à une floraison d'intensité moyenne, ce traitement permettait, en outre, de faire apparaître les effets stimulateurs ou inhibiteurs d'autres substances.

Nous avons essayé ce nouveau traitement sur 6 plants âgés de 11 mois et élevés en JL. Ces plants sont restés en JL pendant 10 semaines après le traitement, puis ils ont été transférés en JC pendant 3 semaines puis, à nouveau, en JL pendant 2 semaines. A la fin de cette séquence, nous

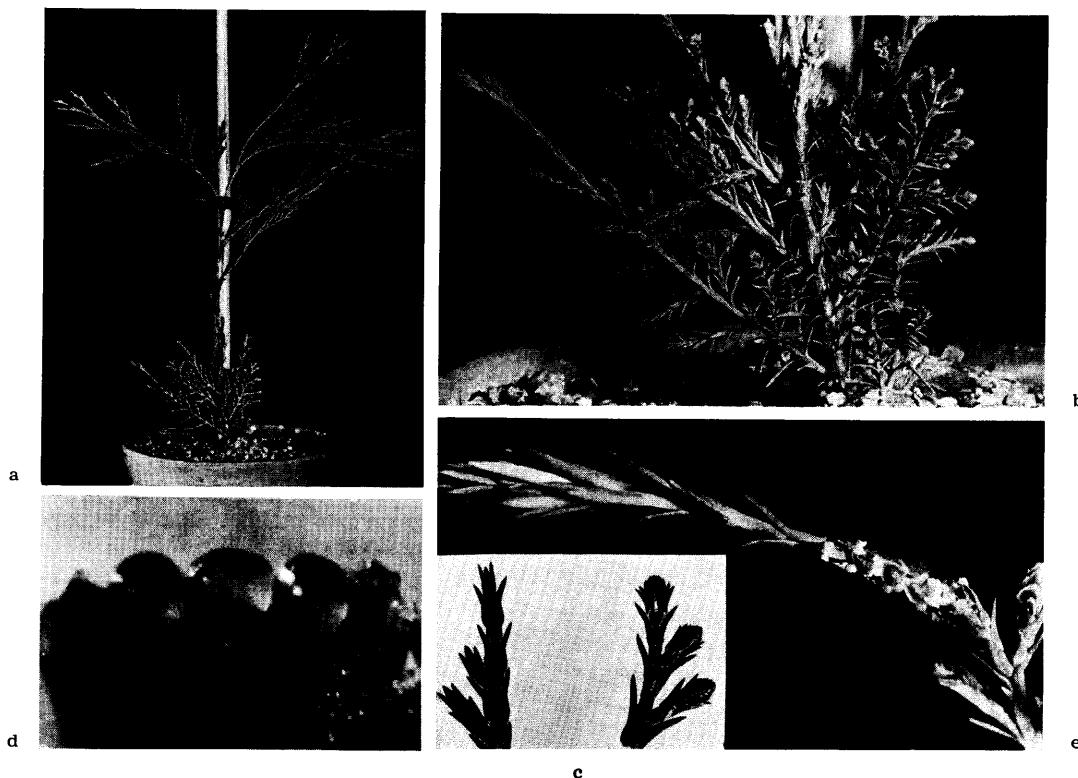


Fig. 5. — Floraison précoce sur plants de *Chamaecyparis lawsoniana* florifère; c: comparaison entre un à l'AG (100 mg/l). — a: vue d'ensemble d'un plant fleuri (la floraison s'est produite sur la partie basse du plant, celle qui existait au début des traitements); b: détail de la zone âgée de 7 mois après 8 traitements rameau végétatif (à gauche) et un rameau floral (à droite); d: écaille fertile mâle avec ses trois sacs polliniques; e: fleur prolifère résultant d'une réversion végétative par suite d'un maintien du plant en JL.



Fig. 6. — Inflorescences femelles de *Cupressus arizonica* provoquées par un traitement à l'AG combiné avec une séquence photopériodique. a: aspect d'un rameau avec cônes femelles; b: section longitudinale d'un cône après fixation, inclusion à la paraffine, et coloration à la safranine-fast green; c: détail d'un jeune ovule en formation.

avons observé 200 inflorescences mâles et 60 femelles. Ce traitement est donc suffisant pour provoquer une bonne floraison.

*Chamaecyparis lawsoniana*. — Au cours de l'expérience préliminaire, aucune toxicité n'avait été observée à la suite des 8 traitements par l'AG à 100 mg/l. Nous avons donc maintenu cette concentration mais en n'appliquant plus qu'un seul traitement, qui s'est avéré tout à fait suffisant.

### III — Actions d'autres substances de croissance employées seules

*Cupressus arizonica*. — Nous avons étudié l'influence d'une cytokinine — la benzyladénine (BA), d'une auxine — l'acide naphtalène-acétique (NAA) —, d'un retardateur de croissance — le chlorure de chlorocholine (CCC) —, et d'un composé capable de libérer de l'éthylène, l'acide 2-chloro-éthanephosphonique (Ethrel). Le résultat des observations est donné dans le Tableau II.

Dans l'expérience 1 un certain nombre de plants traités par la BA, l'Ethrel ou le NAA ont produit quelques rares inflorescences mâles, 2 ou 3 par pied. Nous pensons qu'il s'agit là de contamination par des plantes voisines traitées à l'AG, par suite d'une insuffisance de précautions. En effet

Tableau II. — Effets de diverses régulateurs de croissance sur la floraison et la croissance de *Cupressus arizonica*. — (a) 10 plants par série. — (b) 6 plants par série. — (c) 1 application par semaine. — (d) En pourcentage du témoin.

Traitement	Nomb. d'applica- tions (c)	Plants fleuris	Densité de floraison	Hauteur moyenne (d)
<u>Expérience N°1 (a):</u>				
"Tween 80"	5	0 %	0	100 %
+ AG (100 mg/l)	5	100 %	++++	115
+ BA (1 mg/l)	5	60 %	~0	91
+ Ethrel (200 mg/l)	5	40 %	~0	94
+ NAA (10 mg/l)	5	60 %	~0	98
<u>Expérience N°2 (b):</u>				
+ AG (50 mg/l)	1	100 %	+++	-
+ NAA (50 mg/l)	1	0 %	0	-
+ BA (10 mg/l)	1	0 %	0	-
+ Ethrel (200 mg/l)	1	0 %	0	-
+ CCC (1000 mg/l)	1	0 %	0	-

dans l'expérience 2 pour laquelle seul l'AG (50 mg/l) a permis une floraison, aucun autre traitement n'a entraîné la formation d'inflorescences. On peut donc considérer que, employés seuls, la BA, le NAA, l'Ethrel et le CCC sont incapables de déclencher la floraison.

Par contre, la BA semble favoriser la ramification. L'Ethrel conduit à un raccourcissement des entre-noeuds, ce qui confère aux plants traités un aspect relativement dense. Ni le NAA, ni le CCC n'ont eu d'effets visibles sur la croissance des plants traités.

*Chamaecyparis lawsoniana*. — Sur le *Chamaecyparis lawsoniana*, la BA à 10 mg/l a augmenté légèrement la ramification. A 200 mg/l, l'Ethrel n'a eu aucun effet évident, aussi bien en JL qu'en JC ou au cours d'une séquence JL → JC → JL.

### IV — Effet de combinaisons de substances

Des expériences supplémentaires ont visé à obtenir une floraison dense, à la fois mâle et femelle, et sans toxicité en combinant l'application de plusieurs types de substances de croissance avec divers traitements photopériodiques.

#### 1) *Cupressus arizonica*:

a) Régime de jours longs. — Les traitements que nous avons expérimentés associaient soit l'Ethrel, soit la BA à l'AG. Ils ont été appliqués à des plants âgés de 8 mois au début de l'expérience. Les plantes ont été maintenues en régime de jours longs pendant toute la durée de l'expérience.

Comme le montrent les résultats du Tableau III, l'adjonction d'Ethrel au traitement par l'AG augmente sensiblement la densité de floraison mais se traduit aussi par une toxicité accrue. En particulier, les sommets de tous les plants traités par AG + Ethrel sont morts. Employés séparément aux mêmes concentrations, ni l'AG, ni l'Ethrel

Tableau III. — Effets sur la floraison mâle et la croissance de l'adjonction d'une autre substance de croissance à l'acide gibberellique. — (a) Dix plants par traitement. — (b) Une application par semaine. — (c) En pourcentages de la série témoin.

Traitement (a) (mg/l)	Nombre d'applica- tions (b)	Plants fleuris %	Intensité de floraison	Toxicité % plants	Hauteur moyenne (c)
"Tween 80"	5	0 %	0	0	100 %
+ AG (100)	5	100 %	+++	100	115
+ AG (100) + Ethrel (200)	5	100 %	++++	100	46
+ AG (100) + BA (1)	5	100 %	++	30	117

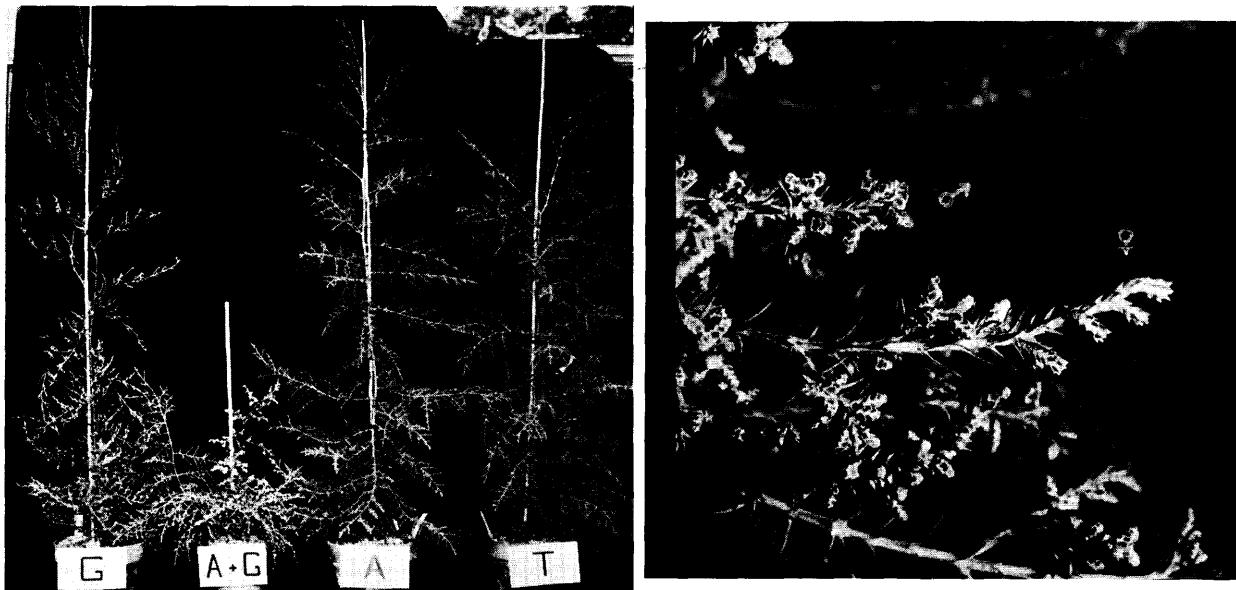


Fig. 7. — Effets de l'AG et de l'Ethrel, seuls ou en combinaison, sur la floraison sur *Cupressus arizonica* âgés de 11 mois. 5 applications à raison d'une fois par semaine. „Tween 80“ (10 g/l) présent dans toutes les solutions. — Fig. 7 a: G = AG (100 mg/l); A + G = Ethrel (200 mg/l) + AG (100 mg/l); A = Ethrel (200 mg/l); T = „Tween 80“ seul (10 g/l). — Fig. 7 b: Détail de la floraison obtenue dans la série A + G.

n'ont eu cet effet. Cependant une concentration d'Ethrel de 1000 mg/l a, dans une autre expérience, tué les sommets chez 50% des plants traités. La figure 7 a montre les effets de l'AG et de l'Ethrel employés seuls ou en association. On constate un effet dépressif net sur la croissance en hauteur et un déséquilibre végétatif-reproducteur, très en faveur de la production de fleurs. De plus, là où n'apparaît normalement qu'une inflorescence mâle, il n'est pas rare d'en voir 2 ou 3 (figure 7 b). Il faut enfin noter que nous n'avons tenu compte que des inflorescences mâles, faute de pouvoir reconnaître les femelles à un stade précoce.

L'adjonction de BA (1mg/l) réduit légèrement la floraison mais permet de maintenir un bon équilibre végétatif-reproducteur (figure 8).

b) *Effet d'une période de jours courts.* — L'effet d'une période de 10 semaines de jours longs ou courts placée immédiatement après un traitement unique a été étudié sur

des séries de 6 plantes, âgées de 11 mois après le semis et élevées jusque là en régime de JL. Immédiatement après la pulvérisation d'AG, les lots ont été soumis aux séquences: JL (10 semaines), puis JC (3 semaines), puis JL, ou bien JC (10 semaines), JL (3 semaines), puis JC.

Les résultats du Tableau IV montrent qu'il n'est pas indispensable que des jours longs suivent le traitement. Cependant, un régime de JC réduit nettement l'ampleur de la floraison. En outre, avec la séquence JC → JL → JC, aucune inflorescence femelle n'est apparue. Il faut aussi remarquer l'effet fortement stimulateur, aussi bien sur la floraison mâle que femelle, de l'adjonction d'Ethrel à l'AG. Le NAA a réduit la floraison.

On peut remarquer que le fait de transférer les plantes dans de nouvelles conditions photopériodiques le jour même du traitement n'empêche pas l'action d'un effet rémanent possible produit par les JL qui ont précédé les pulvérisations d'hormones. Pour lever cette ambiguïté, des plants âgés de 9 mois ont été soumis aux JL, ou aux JC, 2 semaines avant l'application des substances de croissance. Le Tableau V, qui groupe les résultats de cet essai confirme que l'induction est possible en JC; mais la floraison est favorisée par les JL.

Le traitement combinant AG et CCC, qui avait donné de bons résultats précédemment (Tableau IV) s'est avéré peu

Tableau IV. — Effet de la séquence photopériodique à la suite d'un traitement chimique, sur la floraison induite chez *Cupressus arizonic*a. Expérience effectuée en automne.

Traitement (mg/l)	Séquence : JL → JC → JL			Séquence : JC → JL → JC				
	Plants fleuris (%)	Nombre total d' inflorescences	♂	♀	Plants fleuris (%)	Nombre total d' d'inflorescences	♂	♀
"Tween 80"	0	0	0	0	0	0	0	0
+ AG (50)	100	200	60	33	30	0	0	0
+ AG (50) + BA (10)	83	150	0	50	50	0	0	0
+ AG (50) + Ethrel (200)	100	500	100	83	200	0	0	0
+ AG (50) + CCC (1000)	100	300	50	67	200	0	0	0
+ AG (50) + NAA (10)	100	100	10	17	10	0	0	0

Fig. 8. — Influence de l'adjonction de BA au traitement à 1 AG sur *Cupressus arizonic*a. A gauche: AG (100 mg/l) + BA (1 mg/l). A droite: AG (100 mg/l).



Tableau V. — Rôle de la photopériode dans l'induction d'inflorescences mâles et femelles chez *Cupressus arizonica* par un traitement unique. — 9-10 plants par série. Expérience effectuée en été.

	Jours longs (16 h)	Jours courts (10 h)
1) AG (50 mg/l) + Ethrel (200 mg/l):		
Pourcentage de plants avec cônes mâles	100%	70%
Pourcentage de plants avec cônes femelles	44%	30%
2) AG (50 mg/l) + CCC (1000 mg/l):		
Pourcentage de plants avec cônes mâles	70%	10%
Pourcentage de plants avec cônes femelles	30%	0%

efficace dans cet essai. Par ailleurs, il y a eu production d'inflorescences femelles dans la série placée continuellement en JC, ce qui est contradictoire avec les résultats du Tableau IV. L'expérience du Tableau IV ayant été réalisée en novembre et celle du Tableau V en juillet, on peut penser que l'intensité lumineuse joue aussi un rôle et que les journées bien ensoleillées favorisent la production de cônes femelles.

## 2) *Chamaecyparis lawsoniana*:

Un premier essai a porté sur des lots de 3 plants âgés de 15 mois et élevés en JL. Les traitements étaient les suivants: «Tween 80» seul, AG (100 mg/l), BA (10 mg/l), AG (100 mg/l) + BA (10 mg/l) et AG (100 mg/l) + Ethrel (200 mg/l). Deux semaines après le traitement, les plants ont été placés en régime de JC (18 semaines), puis replacés en JL. Tous les lots dont le traitement comportait de l'AG ont produit un grand nombre d'inflorescences mâles. Ces cônes n'ont pas laissé échapper de pollen mûr chez les plantes restées continuellement en JL. Par contre, la séquence JL — JC — JL a permis la maturation des inflorescences mâles qui ont produit du pollen. Cinq mois après le traitement, des inflorescences femelles sont apparues sur le lot traité par AG + Ethrel. Trois de ces ébauches ont donné naissance à de jeunes conelets femelles (figure 9).

Au cours d'expériences plus complètes, nous avons cherché à augmenter l'intensité de la floraison, notamment la floraison que femelle, sur des plants plus jeunes que les précédents.

a) *Influence de la séquence photopériodique*. — Sept lots de 10 plants âgés de 9 mois ont reçu une application d'AG (100 mg/l) + Ethrel (200 mg/l) + BA (10 mg/l). Les lots ont ensuite été répartis dans les conditions indiquées au Tableau VI.



Fig. 9. — Production d'inflorescences mâles et femelles sur un pied de *Chamaecyparis lawsoniana* âgé de 15 mois et traité par une combinaison d'AG et d'Ethrel; production d'un jeune conelet (à droite).

Tableau VI. — Influence de la photopériode sur l'induction d'une floraison mâle et femelle chez *Chamaecyparis lawsoniana* par pulvérisation d'une solution d'AG (100 mg/l) + BA (10 mg/l) + Ethrel (200 mg/l). — Lots de 10 plantes chacun.

Plants fleuris	Séquence photopériodique			
	avec cônes mâles		avec cônes femelles	
	%	intensité (a)	%	intensité (a)
JL	100	+	0	—
JC	90	++	0	—
1 sem. JL, puis JC	100	+++	0	—
2 sem. JL, puis JC	100	+++	20	+
3 sem. JL, puis JC	100	++++	20	++
4 sem. JL, puis JC	100	+++++	40	++
1 sem. JL, puis 4 sem. JC, puis JL	100	++	0	—

(a) de la floraison (nombre de cônes).

On voit que la densité maximum des cônes mâles est obtenue pour le lot ayant subi le maximum de JL avant le passage en JC. Ce passage en JC est indispensable cependant, car le lot demeuré en JL n'a donné qu'une faible floraison. Il y a donc, comme chez *Thuya plicata* (PHARIS et al. 1969) un besoin quantitatif en JL pour l'initiation d'inflorescences mâles, mais cette initiation n'a de résultat que si les plants sont ensuite placés en JC. Il apparaît par ailleurs que la période de JC doit, elle aussi, durer un certain nombre de semaines pour obtenir de bons résultats. C'est ainsi que seulement 4 semaines de JC paraissent insuffisantes.

En ce qui concerne la floraison femelle, et bien qu'elle ait été assez peu abondante dans cet essai, le même besoin quantitatif de JL apparaît mais il semble plus impératif encore, de même que la nécessité de transférer les plants en JC pendant plusieurs semaines. Dans cet essai, aucune inflorescence femelle n'est parvenue à un plein épanouissement.

b) *Influence de diverses combinaisons de substances de croissance*. — Des lots de 10 plants âgés de 9 mois ont reçu les traitements indiqués au Tableau VII. A la suite de ces traitements, les lots sont restés en régime de JL pendant 2 semaines, puis ils ont été transférés en JC où ils sont restés pendant 12 semaines. Après cette période, chaque lot a été partagé en deux séries, l'une restant en JC (série JL → JC), l'autre étant transférée en JL (série JL → JC → JL).

Avant d'étudier les différences dues aux traitements chimiques, une remarque concernant l'effet de la photopériode sur le développement des cônes mâles et femelles s'impose. La floraison mâle a été légèrement plus abondante dans la série JL → JC que dans la série JL → JC → JL, mais les inflorescences mâles sont restées petites et incomplètement développées. Par contre, dans la série JL → JC → JL elles se sont complètement développées et contenait du pollen. Nous n'avons cependant pas observé de déhiscence.

En ce qui concerne la floraison femelle, elle a été beaucoup plus abondante dans la série JL → JC → JL, et les inflorescences sont parvenues au plein épanouissement. La figure 10 montre le stade où s'interrompt le développement de l'ovule dans la série qui reste en JC. En JL (fig. 11), ce développement se poursuit jusqu'à l'obtention de graines (vides dans le cas présent, sans doute par absence de pollen). Cette observation rejoint celle faite par PHARIS et al. (1969) chez *Thuya plicata*.

Quant à la nature du traitement chimique, il semble que, comme pour *Cupressus arizonica*, la meilleure association

Tableau VII. — Influence de diverses substances de croissance sur la floraison mâle et femelle de *Chamaecyparis lawsoniana*. 5 plants par série. Le nombre des croix reflète le nombre de cônes. Dans le cas des cônes femelles, ++ = > 30, +++ = > 300.

Traitement	Séquence JL → JC										Séquence JL → JC → JL									
	Pourcentages de plants avec :										Pourcentage de plants avec :									
	cônes mâles				cônes femelles						cônes mâles				cônes femelles					
	total	+	++	+++	total	+	++	+++	total	+	++	+++	total	+	++	+++	total	+	++	+++
"Tween 80"	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-
+ AG (100 mg/l)	100	-	20	80	60	20	40	0	100	20	20	60	60	20	20	20	20	20	20	20
+ AG (100 mg/l) + Ethrel (200 mg/l)	100	-	20	80	80	60	20	0	100	20	0	80	100	0	20	80	0	20	20	80
+ AG (100 mg/l) + BA (10 mg/l)	100	-	40	60	20	0	20	0	100	0	60	40	80	0	60	20	0	60	20	20
+ AG (100 mg/l) + BA (10 mg/l) + Ethrel (200 mg/l)	100	-	60	40	80	40	20	20	100	20	40	40	80	40	60	0	60	60	0	0
+ BA (10 mg/l) + Ethrel (200 mg/l)	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-

soit AG + Ethrel. En particulier, la présence d'Ethrel stimulate fortement la floraison femelle dans la série JL → JC → JL. Dans la série JL → JC, il n'y a pas de différence sensible. Cette association ne semble pas stimuler particulièrement la floraison mâle. Enfin, la BA ne semble pas intervenir. Elle n'est donc pas utile ici où n'est apparue aucune toxicité de l'AG, à la différence de *Cupressus arizonica*.

## Discussion

**Effet des conditions culturales.** — Les résultats qui viennent d'être présentés, ainsi d'ailleurs que ceux obtenus par d'autres auteurs, PHARIS (1965) en particulier, montrent qu'il est possible de déclencher la floraison de certains conifères sur des plantes très jeunes. Cependant, il faut remarquer que l'âge physiologique de plantes ayant poussé dans un phytotron avec une nutrition riche et des conditions de température et de durée de jour stimulant une croissance rapide est sans doute différent de celui de plantes qui se seraient développées dans des conditions naturelles. Néanmoins, bien que les pieds élevés en serre soient de plus grande taille que des plantes analogues élevées en plein air, ils gardent un feuillage parfaitement juvénile, même au moment de la floraison provoquée par les substances de croissance.

L'intensité lumineuse a joué un rôle dans nos expériences. Ainsi, les traitements AG + Ethrel ont eu des effets toxiques beaucoup plus marqués au début de l'hiver qu'à la fin du printemps. D'autre part, les effets sur la floraison ont été plus longs à apparaître en hiver qu'en été: il a fallu attendre 10 semaines pour voir apparaître des cônes mâles lorsqu'un traitement était administré en octobre, 4 semaines seulement lorsqu'il l'était en juillet. Il est vraisemblable que l'intensité lumineuse permette une photosynthèse plus active, laquelle produit les sucres et autres substances organiques indispensables à la floraison.

**Effet de l'acide gibbérellique.** — De toutes les substances essayées, seul l'acide gibbérellique a joué un rôle déterminant dans l'induction de la floraison, et cela aussi bien chez le *Cupressus arizonica* que chez le *Chamaecyparis lawsoniana*. Un seul traitement (à la concentration de 50 mg/l dans le premier cas, à 100 mg/l dans le second) a suffi à déclencher la formation de cônes. On retrouve donc, chez ces espèces ligneuses, l'effet bien connu d'une seule application de gibbérelline chez de nombreuses plantes herbacées de jours longs.

**Modifications de l'effet de l'acide gibbérellique par d'autres substances.** — Si la benzyladenine, l'acide naphtalène-acétique, l'Ethrel et le CCC n'ont manifesté aucun pouvoir florigène lorsqu'ils étaient seuls, ils ont pourtant modifié plus ou moins l'effet de l'AG. L'Ethrel, en particulier, a nettement augmenté la rapidité et l'intensité de la mise à fleur en présence d'AG chez les deux espèces étudiées. Mais il a aussi provoqué des phénomènes de toxicité, du moins chez le *Cupressus arizonica*. La benzyladénine, elle, tout en réduisant quelque peu l'intensité de la floraison, a annulé les effets toxiques de l'AG chez cette même espèce.



Fig. 10—11. — Effet du régime photopériodique sur le développement des cônes femelles de *Chamaecyparis lawsoniana* âgé de 12 mois et traité par AG + Ethrel. — Fig. 10. — Section longitudinale d'un cône femelle provenant d'un plant resté en JC. a: aspect général; b: détail de deux ovules en formation. Coloration: safranine et fast green. — Fig. 11. — Cf. fig. 10 mais pour un plant transféré en JL. a: aspect général; b: développement de l'ovule en graine (vide sans doute par absence de pollen).

Enfin le CCC a donné des résultats variables; en régime de jours courts, il a fortement diminué l'effet de l'AG.

**Rôle de la photopériode.** — Le régime photopériodique a eu un effet certain sur la floraison tant du point de vue quantitatif que du point de vue qualitatif. Les jours longs augmentent nettement le nombre de cônes produits pour une dose donnée d'AG. Chez le *Chamaecyparis lawsoniana* une période de jours courts après une période de jours longs a été nécessaire pour permettre le développement du pollen jusqu'à maturité.

En ce qui concerne le développement de cônes femelles, la nécessité d'une séquence JL → JC → JL est apparue de façon encore plus nette, principalement chez le *Chamaecyparis*. Ainsi, des plantes de cette espèce maintenues constamment soit en régime de JL soit en régime de JC après le traitement à l'AG n'ont produit aucune inflorescence femelle. Ces inflorescences ne se sont développées que si: (1) la plante avait été conservée pendant un minimum de 2 semaines en régime de JL après l'application d'AG, (2) elle était ensuite soumise à une période de JC. Enfin, l'épanouissement des inflorescences, puis la formation des fruits ne se sont produits qu'après le retour en condition de JL.

**Essais sur d'autres espèces.** — Des traitements analogues à ceux qui ont été décrits ont été pratiqués sur des plants de *Pseudotsuga mensiezii* âgés de 6 mois et des plants de *Larix leptolepis* âgés de 9 mois. La seule réaction observée a été une forte stimulation du bourgeonnement et de la ramifications à la suite du traitement par la BA (10 mg/l) chez le *Pseudotsuga*.

### Conclusion

Les résultats présentés ici confirment l'hypothèse de PHARIS (1967) selon laquelle la plupart des conifères appartenant aux familles des Taxodiacées et Cupressacées seraient susceptibles de fleurir précocement à la suite d'un traitement à la gibbérelline. Nous pensons que l'éthylène, que nous avons appliqué sous forme d'Ethrel, est capable d'amplifier encore davantage le phénomène de mise à fleur précoce.

De plus, il apparaît que, pour ces deux espèces indifférentes à la photopériode en ce qui concerne la croissance, la floraison est soumise de façon relativement stricte à un cycle faisant intervenir jours longs et jours courts. Enfin, nous avons noté que la formation des cônes, surtout les cônes femelles, ne pouvait être abondante et rapidement obtenue que si le végétal était en période de croissance active au moment du traitement hormonal.

### Remerciements

Je tiens tout spécialement à remercier Mr. J. P. NITSCH, sous la direction et grâce aux conseils de qui ce travail a pu être réalisé. Je remercie aussi Mr. P. BOUVAREL, qui m'a permis de travailler dans cette voie et m'a toujours guidé avec beaucoup de sympathique bienveillance. Je veux associer enfin à mes remerciements l'ensemble des chercheurs et techniciens du Laboratoire de Physiologie Pluricellulaire auprès de qui j'ai toujours pu trouver conseils et assistance. Je suis particulièrement reconnaissant à Mlle B. NORREEL qui m'a initié aux techniques histologiques et à qui sont dus la plupart des clichés qui illustrent ce travail.

### Sommaire

L'application foliaire d'acide gibbérellique (AG), seul ou associé à d'autres substances, déclenche, sur des plants âgés de 6 à 12 mois, la floraison précoce de *Cupressus arizonica* GREENE et de *Chamaecyparis lawsoniana* PARL. Cette réaction est très sensible car un seul traitement par l'AG (50 mg/l) suffit à la provoquer. Nous avons pu accentuer

le phénomène en ajoutant de l'Ethrel (acide 2-chloroéthane-phosphonique) à la solution d'AG. Des essais avec la benzyladénine (BA), l'acide naphthalène-acétique (NAA) et le chlorure de 2-chloroéthyltrimethylammonium (CCC) n'ont pas augmenté la floraison. Cependant, la BA, même à faible concentration, semble capable d'éliminer les symptômes de toxicité que provoque l'AG sur *Cupressus arizonica*.

L'induction par l'AG d'inflorescences mâles est possible aussi bien en régime de jours longs (JL) qu'en régime de jours courts (JC), mais nous n'avons jamais obtenu de déhiscence du pollen sur des plants demeurant en jours longs. Les inflorescences femelles de cette espèce nécessitent une séquence JL → JC → JL pour parvenir à maturité. Chez le *Chamaecyparis lawsoniana*, cette séquence est indispensable au complet développement des inflorescences des deux sexes. Plus la durée de la première période de JL est grande, plus il y aura de fleurs femelles; mais les ébauches femelles n'apparaîtront qu'après plusieurs semaines de JC. Enfin, pour que les traitements chimiques soient efficaces, il faut qu'ils soient appliqués au moment où la plante est en croissance active.

### Abstract

Early flowering (production of male and female cones on plants seven to twelve months old) of *Cupressus arizonica* GREENE and of *Chamaecyparis lawsoniana* PARL was obtained with foliar applications of gibberellin acid (GA). A single spray of a GA solution at 50 mg/l, was sufficient.

The flower-inducing effect of GA can be enhanced markedly by Ethrel (2-chloro-ethane-phosphonic acid), which releases ethylene in the tissues. Benzyladenine (BA), naphthalene acetic acid (NAA) and 2-chloroethyl-trimethylammonium chloride (CCC) did not increase flowering. However, BA, which favoured branching, was also able to erase the toxic effects produced by gibberellin treatments on *Cupressus arizonica*.

Production of gibberellin-induced male strobili of *Cupressus arizonica* is possible under both long and short days but shedding of pollen did not occur when the plants were kept permanently under long day conditions. A sequence of long-day → short-day → long-day regimes is apparently necessary for the production of female cones.

In *Chamaecyparis lawsoniana*, such a sequence seems to be necessary for the development of both male and female flowers. A minimum of two weeks of long days after the GA treatment is necessary for the induction of female flowers; the longer this period, the more plentiful are female cones. There is a similar quantitative requirement for the subsequent period of short days. At the end of the short-day treatment, a return to long days is necessary for proper maturation and fruiting of the female strobili. A histological study has shown that, under short days, ovules are differentiated, but stop developing at an early stage. Development continues under long days, leading to the production of seeds.

### Bibliographie

- HASHIZUME, H.: The effect of gibberellin upon flower formation in *Cryptomeria japonica*. Jour. Jap. For. Soc. 41, pp. 375—381 (1959). — HASHIZUME, H.: The effect of gibberellin on flower bud formation in *Cryptomeria japonica*. Changes of endogenous growth substances, carbohydrates and nitrogen in new shoots in relation to flower induction by gibberellin. Jour. Jap. For. Soc. 43, pp. 120—126 (1961). — HASHIZUME, H.: Initiation and development of flower buds in *Cryptomeria japonica*. Jour. Jap. For. Soc. 44, pp. 312—319 (1962). — HASHIZUME, H.: Initiation and development of flower buds in *Chamaecyparis obtusa*. Jour. Jap. For. Soc. 45, pp. 135—141 (1963). — KATO, Y., FUKUHARA, KOBAYASHI: Stimulation of flower bud differentiation of conifers by gibberellin. 2nd meeting Japan Gibberellin Research Assoc., 1958, pp. 67—68. — KATO, Y.: Stimulation of flower bud differentiation of conifers by gibberellin. 4th meeting Japan Gibberellin Research Assoc., 1960, pp. 26—31. — MATTHEWS, J. D.: Factors affecting the production of seed by forest trees.

For. Abstr. 24, n° 1, 13 pp. (1963). — NITSCH, J. P.: Growth responses of woody plants to photoperiodic stimuli. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 70, pp. 512—525 (1957). — NITSCH, J. P., SOMOGYI, L.: Le photopériodisme des plantes ligneuses. Ann. Soc. Nat. Hort. Fr. 16, pp. 466—490 (1958). — NITSCH, J. P.: Deux espèces photopériodiques de jours courts: *Plumbago indica* L. et *P. zeylonica*. Bull. Soc. Bot. France 112, pp. 517—522 (1965). — PHARIS, R. P., RUDDAT, PHILLIPS, HEFTMANN: Precocious flowering of Arizona cypress with gibberellin. Can. Jour. Bot. 43, pp. 923—927 (1965). — PHARIS, R. P., RUDDAT, PHILLIPS, HEFTMANN: Gibberellin, growth retardants and apical dominance in Arizona cypress. Naturwissenschaften 52, pp. 88—89 (1965). — PHARIS, R. P., MORF, W.: Experiments on the precocious flowering of West-

ern Red Cedar and four species of *Cupressus* with gibberellin A<sub>3</sub> and A<sub>4</sub>/A<sub>7</sub> mixture. Can. Jour. Bot. 45, pp. 1519—1524 (1967). — PHARIS, R. P., MORF, W.: Physiology of gibberellin-induced flowering in conifers. "Biochemistry and Physiology of plant growth substances" ed. by F. WIGHTMAN, 1969. — PHARIS, R. P., MORF, W.: Development of the gibberellin induced ovulate strobilus of Western Red Cedar: quantitative requirement for long-day → short-day → long-day. Can. Jour. Bot. 47, pp. 415—420 (1969). — TRONCHET, A., TRONCHET, J., et VUILLEMIN, B.: Effets morphologiques d'un traitement à l'acide gibberélique sur *Polygonum aviculare* L. Ann. Scientif. Univ. Besançon, 2e série, Botanique, Fascicule 20, pp. 13—15 (1964).

## Variation and Inheritance of Levopimamic Acid Content and its Relationship to Oleoresin Yield in Slash Pine

By A. E. SQUILLACE, G. W. HEDRICK, and A. J. GREEN<sup>1</sup>

Levopimamic acid is a potentially useful chemical occurring in moderately large quantities in the oleoresin of slash (*Pinus elliottii* ENGELM.) and longleaf (*P. palustris* MILL.) pines (HEDRICK *et al.*, 1965). Procedures for isolating mixtures of resin acids rich in levopimamic acid were recently described by SUMMERS *et al.* (1963), and the process has a potential for commercial use (SUMMERS *et al.*, 1965). Because these recent developments have a direct bearing on breeding for high oleoresin yield, an exploratory study was undertaken to investigate the feasibility of selection and breeding for high levopimamic acid content and to determine its relationship to oleoresin yield.

### Procedure

A group of 22 trees representing 4 full-sib families and 1 half-sib family and a group of 25 rooted cuttings from 14 clones were sampled. The 18-year-old trees were growing in separate plantations at Olustee, Florida. Both plantations were chipped under commercial methods (BENGSTON and SCHOPMEYER, 1959) in 1964 and 1965 to obtain oleoresin yield. Oleoresin yield data were adjusted to a common base of 10 inches d.b.h. by regression (SCHOPMEYER and LARSON, 1955).

Oleoresin samples for analysis of levopimamic acid content were taken from the progenies on June 22, 1964, and from the clones on May 2, 1966. Eleven of the trees sampled on June 22, 1964, were resampled on December 14, 1964. Methods described by LLOYD and HEDRICK (1961) were used to determine levopimamic acid content, expressed as a percentage of the resin acids.

### Results

**Effect of sampling date.** — In the trees sampled on two dates, average levopimamic acid content was 24.6 percent on June 22 and 26.2 percent on December 14. The difference was not statistically significant, and it was concluded that seasonal effects, if any, are minor.

### Tree-to-tree variation and inheritance:

Differences in levopimamic acid content between ramets of the same clone varied from as little as 0.4 to as much as

7.6 percent, and the clone means varied from 22 to 32 percent. Clonal differences were significant at the 0.05 level ( $F = 3.78$ , with 13 and 11 degrees of freedom for clones and within-clones, respectively). Broad-sense heritability was estimated to be  $0.61 \pm 0.34$  with 90 percent confidence. The means of the five families varied from 22 to 26 percent, but the differences were not statistically significant.

Although the clonal data suggest the presence of genetic variation, more intensive sampling would be required for proof.

### Relationship of levopimamic content to oleoresin yield:

Phenotypic correlation coefficients ( $r$ ) between levopimamic acid content and oleoresin yield were as follows:

	d.f.	r
Between clones	13	.29 NS
Within clones	10	.74**
Total	23	.32 NS
Between families	4	.47 NS
Within families	16	.56*
Total	20	.49*

NS = Nonsignificant

\* = Significant at the .05 level

\*\* = Significant at the .01 level

The results suggest that high oleoresin yielders tend to have high levopimamic acid content, at least when trees are compared within clones or within families.

Among the clones sampled for levopimamic content, 11 had been bred and progeny tested for oleoresin yield. Indices, expressing the oleoresin yielding ability of the progeny of each clone, were computed and compared against levopimamic acid content in a correlation analysis. The correlation coefficient was found to be  $.80$  ( $.48 < r < .93$ , with 90 percent confidence), significant at the .01 level. This correlation suggests that the relationship between oleoresin yield and levopimamic acid content is partially genetic.

### Literature Cited

BENGSTON, GEORGE W., and SCHOPMEYER, C. S.: A gum yield table for  $\frac{1}{4}$ -inch, acid-treated streaks on slash pine. U. S. Forest Serv. Southeast. Forest Exp. Sta. Res. Notes No. 138, 2 pp. (1959). —

<sup>1</sup> Principal Plant Geneticist, Southeastern Forest Experiment Station, Forest Service, U. S. Dept. of Agriculture, Olustee, Florida; Head, Rosin Investigations, and Chemical Technician, Naval Stores Laboratory, Agricultural Research Service, U. S. Dept. of Agriculture, Olustee, Florida.