



HAL
open science

Etude préliminaire sur la germination ” in vitro ” du pollen de colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger) et sur l'évolution dans le temps de son aptitude à germer

Jacques Mesquida, Michel Renard, Brigitte Mesquida

► To cite this version:

Jacques Mesquida, Michel Renard, Brigitte Mesquida. Etude préliminaire sur la germination ” in vitro ” du pollen de colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger) et sur l'évolution dans le temps de son aptitude à germer. *Agronomie*, 1987, 7 (6), pp.409-416. <hal-00885008>

HAL Id: hal-00885008

<https://hal.science/hal-00885008v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Etude préliminaire sur la germination « *in vitro* » du pollen de colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger) et sur l'évolution dans le temps de son aptitude à germer

Jacques MESQUIDA, Michel RENARD (*) & Brigitte MESQUIDA (**)

I.N.R.A., Laboratoire de Zoologie

() Station d'Amélioration des Plantes, Centre de Recherches de Rennes, Domaine de la Motte au Vicomte, B.P. 29, F 35650 Le Rheu*

*(**) I.T.A.P.I., Institut Technique de l'Apiculture, Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes Sociaux, F 91440 Bures-sur-Yvette*

RÉSUMÉ

Les auteurs ont étudié l'aptitude à germer des grains de pollen de colza en fonction de différents facteurs. L'augmentation de la teneur en saccharose, l'addition de broyats de stigmates et la pré-hydratation du pollen n'ont pas amélioré les taux de germination. Les meilleurs taux ont été obtenus (environ 91 p. 100) en milieu alcalin (pH : 8,7 avec addition de tris) proposé par ROBERTS *et al.*, 1983.

Les auteurs ont aussi étudié l'aptitude à germer du pollen de colza en fonction de l'âge des fleurs. Ils obtiennent un taux optimal de germination avec du pollen prélevé à la déhiscence des anthères. Ils constatent ensuite que les taux diminuent rapidement avec le vieillissement des fleurs. La perte de l'aptitude à germer se situe entre 20 et 72 p. 100 en moins de 24 h et de près de 90 p. 100 en 48 h, elle est presque totale en 72 h. L'intérêt pratique et agronomique de cette étude est discuté.

Mots clés additionnels : *Saccharose, stigmates, hydratation, pH, pollen trinuécléé, température, serre, culture de plein champ.*

SUMMARY

Preliminary study on in vitro germination of rapeseed (Brassica napus L. var. oleifera) pollen.

The incidence of different factors on *in vitro* germination of rapeseed pollen was studied. Increase in sucrose concentration, addition of ground stigmas or prehydration of the pollen did not improve the percentage of germination. The best percentage (91 %) was obtained with the alkaline medium proposed by ROBERTS *et al.*, 1983 (pH 8.7 with addition of tris). The effect of flower age was also studied. The best germination was at the anther dehiscence stage, and percentage germination decreased rapidly thereafter : by 20 and 70 % in 24 h, by about 90 % in 48 h and completely in 72 h. The practical and agronomical value of this study is discussed.

Additional key words : *Sucrose, stigmas, hydration, pH, trinucleate pollen, temperature, greenhouse, field crop.*

I. INTRODUCTION

Après leur libération des anthères, les grains de pollen restent vivants pendant un temps plus ou moins long selon les espèces (KNOX, 1979 ; DUMAS *et al.*, 1984a) que l'on peut estimer de plusieurs façons (DUMAS *et al.*, 1984b). Par des tests classiques (test fluorochromatique FCR de HESLOP-HARRISON & HESLOP-HARRISON, 1970 par exemple), ou par l'emploi de la spectrométrie à résonance magnétique

nucléaire RMN (DUPLAN & DUMAS, 1984), on détermine la viabilité du pollen. Mais l'aptitude à la germination, caractérisée par l'émission effective d'un tube pollinique, ne correspond pas exactement à la viabilité puisque du pollen dit « viable » ne germe pas si les conditions de milieu ne conviennent pas. Certes, ces deux critères « viabilité » et « aptitude à la germination » sont corrélés entre eux (SHIVANNA & HESLOP-HARRISON, 1981). Mais les grains de pollen perdent leur aptitude à germer alors qu'ils sont toujours

vivants et qu'ils paraissent encore viables (DUMAS *et al.*, 1984a). Ils deviennent dès lors inefficaces pour la fécondation. « Viabilité » et surtout « aptitude à germer » des grains de pollen font partie des principaux paramètres de la pollinisation.

Des travaux récents ont montré que le pollen de colza (*Brassica napus* var. *oleifera*) conserve sa viabilité durant une semaine à 20 °C (DUMAS *et al.*, 1984a), mais on est peu renseigné sur son aptitude à germer. En utilisant des milieux proposés par certains auteurs sur le chou, nous avons entrepris de nous intéresser à la germination « *in vitro* » du pollen de colza dans le but de nous permettre de développer par la suite des études sur les problèmes de pollinisation entomophile du colza.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Il existe de nombreuses méthodes d'étude de la germination « *in vitro* » du pollen ; on en trouvera une présentation synthétique, ainsi que les principaux résultats obtenus dans l'ouvrage de STANLEY & LINSKENS (1974).

A. Origine des pollens

On a utilisé du pollen de colza d'hiver de la lignée « Jet neuf » cultivée en serre ou en plein champ.

B. Milieu de germination

Notons qu'il existe 2 catégories de pollen, les pollens bicellulés et tricellulés — ou trinucclés — (DEYSSON, 1963 ; KNOX, 1979). Ces derniers ont la particularité d'être plus difficiles à faire germer « *in vitro* » que les bicellulés (BREWBAKER, 1957 ; STANLEY & LINSKENS, 1974 ; BAR-SHALOM & MATTSSON, 1977 ; ROBERTS *et al.*, 1983 ; DUMAS, 1984). Or, les pollens de *Brassica* appartiennent précisément à la catégorie des pollens tricellulés. Mais des travaux récents entrepris par HODGKIN *et al.* (1982) ; HODGKIN (1983) et ROBERTS *et al.* (1983) ont finalement proposé des milieux de germination alcalins qui donnent chez le chou (*B. oleracea*) des pourcentages de germination satisfaisants. Pour le colza, on a donc utilisé les milieux de références proposés et décrits par HODGKIN *et al.* (1982) : milieu du type A, et par ROBERTS *et al.* (1983) : milieu du type B. Ils renferment respectivement :

(A). 200 g/l de saccharose, 0,6 g/l de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/l de $\text{H}_3 \text{BO}_3$, 0,1 g/l de KNO_3 , 0,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ et 0,07 ml/l de NH_3 .

(B). 3 g de saccharose et 1 à 2 mg de tris dans 15 ml d'une solution stérile contenant 0,1 g/l de KNO_3 , 0,362 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ et 0,01 g/l de $\text{H}_3 \text{BO}_3$ (soit par l de milieu : 200 g de saccharose et 0,066 à 0,133 g de tris).

On a fait varier le pH du milieu du type B (fig. 1) par addition de tris (1) selon une gamme de concen-

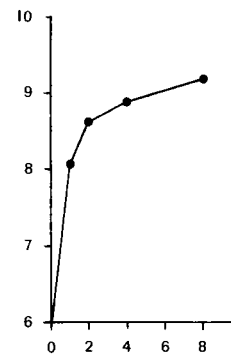


Figure 1

Evolution du pH du milieu de germination par addition de tris.
Change in pH of the medium by addition of tris.

En ordonnée : pH du milieu
pH of the medium.

En abscisse : Quantités de tris ajoutées au milieu de germination du type B (en mg).
Quantity in mg of tris added to the B type medium.

2 - ou 0,066 g/l	6 - ou 0,399 g/l
2 - or 0.066 g/l	6 - or 0.399 g/l
4 - ou 0,266 g/l	8 - ou 0,532 g/l
4 - or 0.266 g/l	8 - or 0.532 g/l

trations croissantes (progression géométrique de raison 2).

C. Techniques et observations effectuées

Tous les essais de germination « *in vitro* » ont été répétés trois fois. Les germinations ont été suivies en étuve à 25 °C à l'obscurité, en ambiance saturée d'humidité selon la technique classique dite « d'examen en goutte pendante » décrite par les auteurs (LANGERON, 1949 ; STANLEY & LINSKENS, 1974, etc.). Sur chaque goutte, on s'est efforcé de déposer une égale quantité de pollen suffisamment dense.

On a exprimé l'âge du pollen en heure et en jour, par périodes de 24 h correspondant à l'intervalle de temps compris entre la déhiscence des anthères (ouverture des anthères sur le 1/3 supérieur environ) et son dépôt sur le milieu d'incubation. Le pollen du 1^{er} j concerne donc celui prélevé et mis à germer le jour même de la déhiscence des anthères (j0) ; le pollen du 2^e j (j1) est celui qui correspond au pollen dont la déhiscence a été repérée la veille à la même heure, etc...

Le taux de germination a été évalué par dénombrement sous microscope photonique (grossissement : 200 fois), des grains de pollen germés et non germés situés dans un champ de vision (surface : 0,385 mm²). On compte environ 50 à 100 grains de pollen dans cet espace. Par lame, on effectue 3 comptages successifs dans 3 espaces différents. On considère un grain de pollen germé lorsque son tube pollinique est plus long que son diamètre.

D. Facteurs étudiés

1. Influence du pH des milieux

On a effectué des essais de germination dans des milieux du type A et B dont on a fait varier le pH par addition de tris : pH = 7,73 et 8,20, pour le milieu A

(1) Tris utilisé : Tris - (hydroxyméthyl) aminométhane : $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$. = produit tampon marque : R.P. Normapur pour analyses.

et pH = 7,50 et 8,50 pour le milieu B et d'ammoniac : pH = 9,30 pour le milieu A. On a utilisé du pollen du 1^{er} j (J0).

2. Influence du pH en fonction de l'âge du pollen

On a comparé les taux de germination du pollen du 1^{er} j (j0) et du 4^e j (j3) obtenus dans des milieux du type B dont on a fait varier le pH par addition de tris : pH = 8,0, 8,45 et 8,80.

3. Influence du saccharose en fonction de l'âge du pollen

On a étudié l'influence de la teneur en saccharose (3 g, 4 g et 6 g) du milieu du type B (pH = 8,7) sur les taux de germination obtenus avec du pollen du 1^{er} j (j0) et du 2^e j (j1).

4. Influence de la pré-hydratation et de l'addition de stigmates

Dans cet essai, on a utilisé le milieu du type B (pH = 8,1) avec et sans addition de stigmates sur lequel on a comparé les taux de germination obtenus avec du pollen du 1^{er} j (j0) pré-hydraté pendant 2 h et 4 h et de celui non pré-hydraté (témoin).

L'addition de stigmates broyés provenant de la même variété que le pollen, a été effectuée à raison de 2 stigmates pour 10 µl de milieu soit une dose double de celle utilisée par ROBERTS *et al.* (1983) chez le chou.

On a pré-hydraté le pollen pendant 2 h et 4 h par un passage à une humidité relative de 75 p. 100 avant leur mise en germination. Les fleurs étaient enfermées dans des enceintes transparentes d'un volume de 12 l environ à la température de 20 °C. Ces appareils décrits par BRUN & BAUTRAIS (1985), ont été conçus pour des études de laboratoire en milieu humide sur l'évolution des maladies à champignons du colza.

E. Evolution dans le temps de la faculté germinative du pollen

Pour cette étude, on a effectué sur des plantes cultivées en serre et en extérieur, des essais de germination « in vitro » du pollen de fleurs d'âge différent à partir de la déhiscence des anthères.

Avec les plantes cultivées en serre, les germinations ont été effectuées le 6 avril 1984 sur du pollen du 1^{er} au 4^e j (j0 à j3), (soit du 3 au 6 avril) en utilisant le milieu du type B à pH = 8,78 et 8,26. Durant cette période les températures de la serre se sont situées entre 18 et 20 °C.

Avec les plantes de l'extérieur, les germinations ont été effectuées : l'une, le 19 avril 1984 sur du pollen du 1^{er} au 3^e j (j0 à j2), (soit du 16 au 19 avril) en utilisant le milieu du type B à pH = 8,70 ; l'autre, le 18 mai 1984 sur du pollen du 1^{er} au 4^e j (j0 à j3), (soit du 14 au 17 mai) en utilisant toujours le milieu du type B à pH = 8,24. Les conditions de température relevées sous abri au cours de ces deux périodes sont données dans le tableau 1. Les fleurs de plein champ étaient protégées des insectes pollinisateurs par un sac en papier.

TABLEAU 1

Relevés des températures sous abri du 16 au 19 avril 1984 et du 14 au 17 mai 1984. Station Météorologique de Le Rheu (I.N.R.A.) en Bretagne (Département Ille-et-Vilaine).

Records of temperatures under shelter (16-19 April and 14-17 May 1984). Meteorological Station in Le Rheu (I.N.R.A.) in Brittany (Ille-et-Vilaine Dept).

Dates	Tm	TM	MOY
16.04.84	1.6°	12.1°	6.9°
17.04.84	- 0.1°	13.8°	6.9°
18.04.84	1.1°	16.0°	8.5°
19.04.84	5.0°	17.5°	11.5°
14.05.84	7.5°	11.9°	9.4°
15.05.84	8.0°	12.1°	10.1°
16.05.84	7.5°	14.3°	10.9°
17.05.84	8.7°	13.2°	11.0°

Tm = Température minimale - minimal temperature.
TM = Température Maximale - maximal temperature.
MOY = Température Moyenne - mean temperature.

III. RÉSULTATS

A. Choix du milieu d'incubation

1. Influence du pH et du milieu

a) La figure 2 montre qu'après 1 h d'incubation, on observe des effets combinés du pH et du milieu de germination (milieu A et B). Ils ne s'observent plus

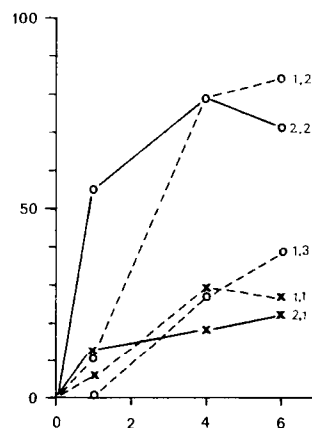


Figure 2

Taux moyens de germination « in vitro » du pollen de colza en fonction du milieu (type A et B) et du pH.

Mean percentage in vitro germination of rape pollen in different media (A and B) and at different pH.

En ordonnée : Taux de germination (en p. 100).
Percentage germination.

En abscisse : Durée d'incubation du pollen (en h).
Duration of pollen incubation (in h).

Courbe 1.1. - Milieu du type A, pH : 7,73.

Curve 1.1. - A type medium, pH : 7.73.

Courbe 1.2. - Milieu du type A, pH : 8,20.

Curve 1.2. - A type medium, pH : 8.20.

Courbe 1.3. - Milieu du type A, pH : 9,30.

Curve 1.3. - A type medium, pH : 9.30.

Courbe 2.1. - Milieu du type B, pH : 7,50.

Curve 2.1. - B type medium, pH : 7.50.

Courbe 2.2. - Milieu du type B, pH : 8,50.

Curve 2.2. - B type medium, pH : 8.50.

ensuite. En effet, la vitesse de germination est plus rapide en milieu B dont le pH est supérieur à 8 (pH = 8,50, courbe 2.2, fig. 2). Le taux moyen de germination (55,8 p. 100) est significativement plus élevé que celui observé en milieu A (11 p. 100) dont le pH est également supérieur à 8 (pH = 8,20, courbe 1.2).

b) A l'exception de la courbe 1.3 (fig. 2), les différences qui apparaissent cette fois entre toutes les autres courbes, que ce soit à 4 h ou à 6 h d'incubation, s'expliquent par un effet dû au pH du milieu. On distingue d'ailleurs deux groupes :

- l'un, où les taux moyens sont les plus importants (72 et 83 p. 100) ; ils correspondent aux milieux du type A et B dont le pH est supérieur à 8 (pH = 8,2 et 8,5, courbes 1.2 et 2.2, fig. 2) ;

- l'autre, où les taux moyens inférieurs à 30 p. 100 correspondent aux milieux également du type A et B, mais dont le pH est inférieur à 8 (7,50 et 7,73, courbes 2.1 et 1.1, fig. 2).

Il est intéressant de remarquer que la courbe obtenue avec le milieu du type A (courbe 1.3, fig. 2) dont l'alcalinité est élevée (pH = 9,3), est intermédiaire.

2. Influence du pH en fonction de l'âge du pollen

La figure 3 confirme l'effet pH du milieu sur la germination du pollen observé précédemment. Les taux de germination semblent augmenter proportionnellement avec le pH du milieu comme le montrent les courbes 1.1, 1.2 et 1.3 de la figure 3 dont les pH sont respective-

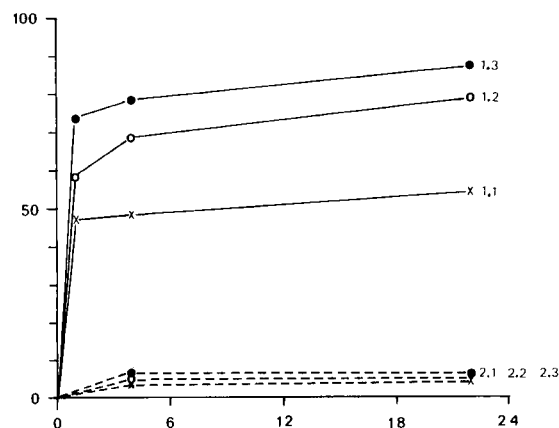


Figure 3

Taux moyens de germination « in vitro » du pollen de colza en fonction de l'âge du pollen et du pH du milieu (type B).
Mean percentage pollen germination at different pollen ages and at different pH (medium B).

En ordonnée : Taux de germination (en p. 100).
Percentage germination.

En abscisse : Durée d'incubation du pollen (en h).
Duration of pollen incubation (in h).

Courbe 1.1. - Pollen du 1^{er} j, pH : 8,00.
Curve 1.1. - First day pollen, pH : 8.00.
Courbe 1.2. - Pollen du 1^{er} j, pH : 8,45.
Curve 1.2. - First day pollen, pH : 8.45.
Courbe 1.3. - Pollen du 1^{er} j, pH : 8,80.
Curve 1.3. - First day pollen, pH : 8.80.
Courbe 2.1. - Pollen du 4^e j, pH : 8,00.
Curve 2.1. - Fourth day pollen, pH : 8.00.
Courbe 2.2. - Pollen du 4^e j, pH : 8,45.
Curve 2.2. - Fourth day pollen, pH : 8.45.
Courbe 2.3. - Pollen du 4^e j, pH : 8,80.
Curve 2.3. - Fourth day pollen, pH : 8.80.

ment de 8,0 ; 8,45 et 8,80. Mais ces courbes montrent aussi que l'âge du pollen joue également un rôle important ; ainsi, dans des conditions identiques, le pollen du 1^{er} j a une bien meilleure aptitude à germer que celui du 4^e j qui germe par contre, très mal (7 p. 100 de germination au maximum). Le pollen du 1^{er} j se caractérise également par une vitesse de germination accrue : à 1 h d'incubation, les taux se situent déjà entre 45 et 75 p. 100 selon le pH du milieu et ils se situent entre 55 et 86 p. 100 à 22 h d'incubation.

On a regroupé sur la figure 4, les données de ces 2 essais en tenant compte des taux moyens de germination du pollen du même âge. Cette opération met en évidence la relation existant entre pH et germination. Le pH donnant 25 p. 100 de germination est voisin de 7,5, celui donnant 50 p. 100 est voisin de 8,0 et enfin, celui donnant près de 90 p. 100 est voisin de 8,8.

Mais ensuite, avec un pH de 9,3, le taux de germination diminue fortement comme on l'a déjà signalé (cf. courbe 1.3, fig. 2).

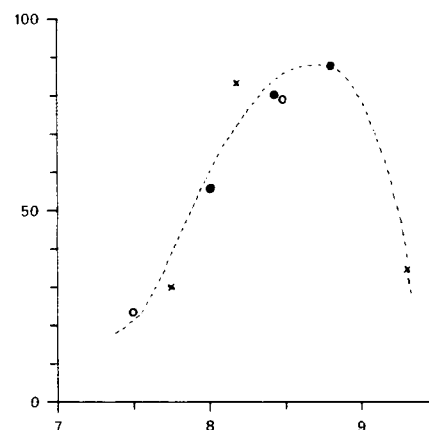


Figure 4

Effets du pH du milieu sur les taux moyens de germination « in vitro » du pollen de colza du 1^{er} j.
Effect of pH on mean percentage of germination of first day pollen of rapeseed.

En ordonnée : Taux de germination (en p. 100).
Percentage germination.

En abscisse : pH du milieu de germination.
pH of the medium.

× Taux moyens du milieu A (données fig. 2).

Mean percentages in the A medium (Fig. 2 data).

○ Taux moyens du milieu B (données fig. 2).

Mean percentages in the B medium (Fig. 2 data).

● Taux moyens du milieu B (données fig. 3).

Mean percentages in the B medium (Fig. 3 data).

3. Influence du saccharose en fonction de l'âge du pollen

La figure 5 montre l'influence de la teneur en saccharose sur la germination du pollen selon son âge.

C'est ainsi qu'avec du pollen du 1^{er} j (j0), le taux de germination décroît lorsque le taux de saccharose augmente (courbe 1, fig. 5). La germination est maximale avec 3 g (200 g/l) de saccharose (moyenne : 79,8 p. 100), elle diminue significativement ensuite avec 4 g (267 g/l) (moyenne : 59,6 p. 100) et elle est pratiquement inhibée avec 6 g (400 g/l) (moyenne : 1 p. 100). Bien que l'on observe à peu près le même phénomène dû à l'effet saccharose, avec le pollen du

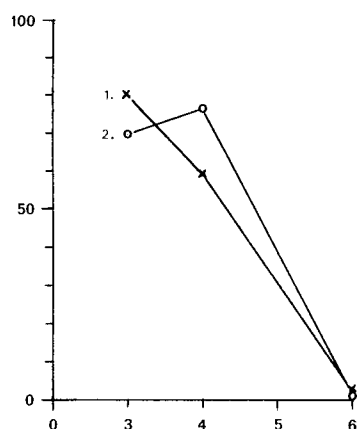


Figure 5

Taux moyens de germination « in vitro » du pollen de colza à 3 h d'incubation en fonction de la quantité de saccharose du milieu et de l'âge.

Effect of quantity of sucrose and of flower age on percentage in vitro germination of rapeseed pollen after 3 h of incubation.

En ordonnée : Taux de germination (en p. 100).

Percentage germination.

En abscisse : Quantities of sucrose (g) added to the germination medium. 1 = pollen du 1^{er} j (j0) ; 2 = pollen du 2^e j (j1).

Quantities of sucrose (g) added to the germinating medium. 1 = first day pollen, 2 = 2nd day pollen.

3 - ou 200 g/l

3 - or 200 g/l

4 - ou 267 g/l

4 - or 267 g/l

6 - ou 400 g/l

6 - or 400 g/l.

2^e j (j1), la courbe décroît cependant moins régulièrement (courbe 2, fig. 5) que la précédente. Elle est, en effet caractérisée par un léger redressement qui survient avec le milieu renfermant 4 g (267 g/l) de saccharose, puis la germination est inhibée avec 6 g (400 g/l) de saccharose. Les taux moyens de germination (courbe 2, fig. 5) qui sont de 70,2 p. 100 avec 3 g (200 g/l) passent à 76,4 p. 100 avec 4 g (267 g/l). Mais, statistiquement ces différences ne sont pas significatives, elles le sont par contre, si l'on compare, à dose égale de saccharose : 4 g (267 g/l), les moyennes obtenues avec les pollens d'âge différent (j0 et j1, courbes 1 et 2, fig. 5).

4. Influence de la pré-hydratation et de l'addition de stigmates broyés

Les résultats groupés dans le tableau 2 montrent que l'addition de stigmates dans les milieux (traitements 2.1 ; 2.2 et 2.3 du tabl. 2), ainsi que la pré-hydratation du pollen frais, n'améliorent pas du tout le taux de germination.

La pré-hydratation de 4 h (1.3 et 2.3, tabl. 2) semble agir davantage en retardant la germination. Celle-ci est ensuite suivie d'un phénomène de rattrapage à 18 h d'incubation.

B. Evolution dans le temps de l'aptitude à germer du pollen de colza

Les courbes de variations journalières des taux moyens de germination du pollen de colza groupées

TABLEAU 2

Taux moyens de germination « in vitro » du pollen de colza dans des milieux, avec ou sans addition de stigmates et avec ou sans pré-hydratation préalable des fleurs (HR* = 75 %) de 2 h et de 4 h.

Mean percentage of in vitro germination of rapeseed pollen with or without addition of stigmas in the medium, and with or without flower prehydration for 2 or 4 h (RH = 75 %).

Traitements du pollen	Pourcentages de germination du pollen		
	à 2 h d'incubation	à 18 h d'incubation	
1	1.1	51,2 (a) (± 14,5)	78,3 (a) (± 10,4)
	1.2	61,9 (a) (± 7,3)	76,8 (a) (± 2,2)
	1.3	9,0 (b) (± 4,3)	67,0 (a) (± 7,2)
2	2.1	49,5 (a) (± 7,3)	67,6 (a) (± 3,5)
	2.2	40,8 (a) (± 5,8)	69,8 (a) (± 2,9)
	2.3	9,7 (b) (± 3,2)	36,6 (b) (± 13,2)
Différences		**	**

1. - Milieu sans stigmates.
Medium without stigmas.

2. - Milieu avec stigmates.
Medium with stigmas.

1.1. - Milieu sans stigmates et sans pré-hydratation des fleurs.
Without stigmas and without flower prehydration.

1.2. - Milieu sans stigmates avec pré-hydratation des fleurs de 2 h.
Without stigmas and with flower prehydration for 2 h.

1.3. - Milieu sans stigmates avec pré-hydratation des fleurs de 4 h.
Without stigmas and with flower prehydration for 4 h.

2.1. - Milieu avec stigmates sans pré-hydratation des fleurs.
With stigmas and without flower prehydration.

2.2. - Milieu avec stigmates avec pré-hydratation des fleurs de 2 h.
With stigmas and with flower prehydration for 2 h.

2.3. - Milieu avec stigmates avec pré-hydratation des fleurs de 4 h.
With stigmas and with flower prehydration for 4 h.

Les moyennes sont données avec l'erreur-type ($\pm s/\sqrt{n}$).

Mean values are indicated with standard error.

** Différences significatives à P = 0,01 (test F de FISHER).

Significant differences at P = 0.01 (FISHER'S test).

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes.

Mean values with the same letter are not significantly different.

(*) HR : Humidité relative.

RH : Relative Humidity.

dans la figure 6, concernant les plantes de serre (courbes 1.1 et 1.2) et de plein champ (courbes 2.1 et 2.2). Elles font apparaître une diminution rapide de l'aptitude à germer du pollen avec son âge. Le phénomène semble plus marqué chez les plantes de l'extérieur que chez celles de la serre : notons qu'en serre, les températures voisines de 20 °C n'ont pas beaucoup varié, alors qu'en extérieur, les variations étaient naturellement plus grandes (tabl. 1). Les différences qui s'observent entre les courbes 1.1 et 1.2 sont liées à l'effet pH du milieu comme on l'a vu précédemment.

Au 1^{er} j (j0), les taux moyens sont maximaux dans tous les cas. Ils se situent entre 61 et 91 p. 100 (courbe

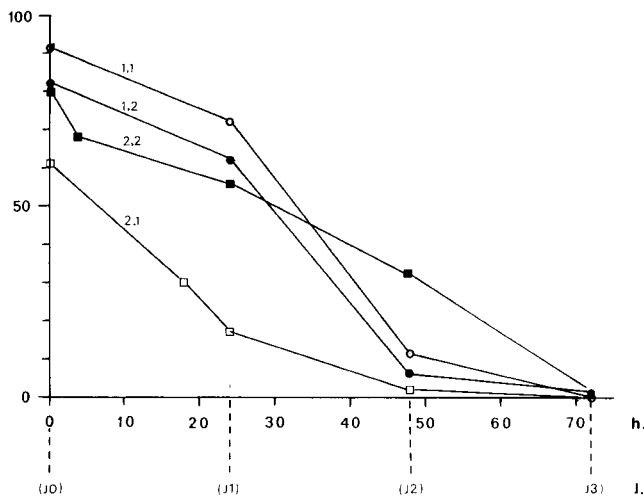


Figure 6

Variations journalières des taux moyens de germination « in vitro » du pollen de colza de serre et de plein champ à 4 h d'incubation. Daily variation in mean percentage in vitro germination of rapeseed pollen in the greenhouse and in the field after 4 h of incubation.

En ordonnée : Taux de germination (en p. 100).
Percentage germination.

En abscisse : Age du pollen (en h et en j) à partir de la déhiscence des anthères : j0 = pollen du 1^{er} j, j1 = pollen du 2^e j (ou j + 24 h), j2 = pollen du 3^e j (ou j + 48 h), j3 = pollen du 4^e j (ou j + 72 h).
Age of pollen (in h and days) from the dehiscence of anthers : j0 = first day pollen, j1 = second day pollen (or j + 24 h), j2 = third day pollen (or j + 48 h), j3 = fourth day pollen (or j + 72 h).

Courbe 1.1. - Plantes de serre, milieu B, pH : 8,78.

Curve 1.1. - Greenhouse plants, B medium, pH : 8.78.

Courbe 1.2. - Plantes de serre, milieu B, pH : 8,26.

Curve 1.2. - Greenhouse plants, B medium, pH : 8.26.

Courbe 2.1. - Plantes de plein champ, milieu B, pH : 8,70.

Curve 2.1. - Field plants, B medium, pH : 8.70.

Courbe 2.2. - Plantes de plein champ, milieu B, pH : 8,24.

Curve 2.2. - Field plants, B medium, pH : 8.24.

1.1 : 91 p. 100 ; courbe 1.2 : 82 p. 100 ; courbe 2.1 : 61 p. 100 et courbe 2.2 : 80 p. 100). Au 2^e j (j1), on enregistre une perte de la faculté germinative de 20 à 72 p. 100 ; la perte de celle du pollen de plein champ (courbe 2.1) est déjà près de 51 p. 100 avec du pollen âgé de 18 h (taux moyen : 30 p. 100). Au 3^e j (j2), les taux sont très bas (courbe 1.1 : 11 p. 100 ; courbe 1.2 : 6 p. 100 ; courbe 2.1 : 2 p. 100 ; courbe 2.2 : 32 p. 100). Au 4^e j (j3), la germination est nulle ou très faible dans un cas (2 p. 100, courbe 2.2).

IV. DISCUSSION - CONCLUSION

Les résultats obtenus permettent de faire les remarques suivantes :

1 — Le milieu proposé par ROBERTS *et al.* (1983) a été retenu pour effectuer notre étude sur la germination « in vitro » du pollen de colza et nos résultats confirment ceux de ces auteurs. Il permet en effet d'obtenir en milieu alcalin (pH entre 8 et 9), en quelques heures d'incubation (moins de 3 h), des taux de germination satisfaisants (entre 80 et 90 p. 100).

Le pH du milieu joue un rôle important en favorisant dans une certaine limite la germination du pollen.

Une proportionnalité semble d'ailleurs s'établir entre eux. Mais au-delà d'un certain seuil, le pH du milieu peut aussi devenir un facteur limitant de la germination, le taux régresse alors par excès d'alcalinité. Chez le colza, cet effet seuil semble se produire lorsque le pH est voisin de 8,8 avec addition de tris.

Ces résultats sont en accord avec ceux de ROBERTS *et al.* (1983) et de HODGKIN (1983) qui obtiennent aussi, chez le chou, une augmentation des taux de germination en fonction du pH du milieu semblable à celle que l'on observe sur colza. D'après ces auteurs, à partir d'un pH seuil, le taux de germination est inversement proportionnel à l'augmentation du pH et la germination est totalement inhibée au-delà d'un pH de 10.

Mais ces travaux font en outre apparaître une variation du seuil selon le produit additif utilisé pour modifier le pH. Ainsi, ROBERTS *et al.* (1983) avec le tris, obtiennent un pic donnant environ 90 p. 100 de germination lorsque le pH est voisin de 9 ; avec un pH voisin de 9,8 le taux de germination est fortement réduit (12 p. 100 environ). Avec la méthylamine, le pic donnant environ 90 p. 100 de germination se situe cette fois lorsque le pH est de 10, avec un pH de 11, la germination est entièrement inhibée. Avec l'hydroxide de sodium, le pH donnant 20 p. 100 de germination seulement est de 8,8, alors qu'il donne environ 80 p. 100 dans les mêmes conditions avec du tris. Enfin, HODGKIN (1983) toujours chez le chou et avec addition de taps (1) dans le milieu, montre que le taux maximal de germination (87 p. 100) est atteint avec un pH de 8,0 et avec un pH de 8,4, il observe déjà une diminution sensible (70 p. 100) qui s'accroît (38 p. 100) avec un pH de 8,8.

2 — L'influence du saccharose se présente sous 2 aspects :

- le premier, concerne l'effet du saccharose sur du pollen du 1^{er} j (j0). La dose optimale semble se situer à 3 g de saccharose comme le préconisent d'ailleurs ROBERTS *et al.* (1983) et, au-delà de ce seuil, l'effet sur la germination du pollen apparaît inversement proportionnelle à la dose indiquée et l'inhibition survient à la dose double. Ces résultats vont d'ailleurs dans le sens de ceux observés sur du pollen de chou par FERRARI & WALLACE (1975).

- Le deuxième aspect concerne le pollen du 2^e j (j1) où la réponse aux doses de saccharose du milieu ne semble pas être la même que celle observée avec du pollen du 1^{er} j (j0). On constate, en effet, que le taux optimum de germination a plutôt tendance à se maintenir cette fois, dans un milieu renfermant plus de saccharose (4 g au lieu de 3). Mais on considère que ces résultats sont insuffisants pour conclure valablement à un effet saccharose du milieu. Ce phénomène pose cependant un problème non négligeable et resterait à vérifier plus en détail sur du pollen d'âge différent et aussi sur celui plus vieux conservé au froid, par exemple, pour utilisation ultérieure. En effet, sur du pollen emmagasiné depuis plusieurs mois (pollen de Gymnospermes), CHAUVIN (1968) rapporte que le taux de germination augmente avec la teneur en saccharose du milieu.

(1) Taps : acide (tris (hydroxyméthyl) méthylamino)-2 propanesulfonique C₇H₁₇NO₆S.

3 — La pré-hydratation du pollen frais et l'addition de stigmates dans le milieu, dans les conditions de notre expérimentation et avec la lignée de colza utilisée, ne semblent pas améliorer le taux de germination du pollen. Ces traitements apparaissent au contraire plutôt défavorables. C'est le cas de la pré-hydratation (technique utilisée sur pollen frais, par ROBERTS *et al.*, 1983 et sur pollen conservé, par CHARPENTIER & BONNET-MASIMBERT, 1983) de 4 h qui a retardé et a diminué significativement les taux de germination en dépit même d'un important phénomène de rattrapage observé entre 2 h et 18 h d'incubation. C'est le cas aussi de la présence de stigmates dans le milieu qui a eu, dans tous les cas examinés, tendance à diminuer la faculté germinative du pollen. CHOLLET (1965) considère d'ailleurs, chez le poirier, que l'addition de stigmates, qui favorise généralement la germination par diffusion de substances de croissance, a cependant pour conséquence d'accroître également la teneur en substances inhibitrices de la germination lorsque les stigmates sont nombreux. Dans le cas de nos essais, les quantités de stigmates ajoutées aux milieux n'ont entraîné qu'une inhibition partielle de la germination.

En général, notons que les sélectionneurs sont conduits à effectuer couramment des additions de stigmates, de même variété ou de variétés différentes de celle du pollen, dans les milieux de germination pour mettre en évidence d'éventuels problèmes d'incompatibilité. Tel n'est pas notre but avec la lignée de colza utilisée qui est plutôt autofertile et qui n'a pas de problèmes d'incompatibilité. Notre but est plutôt de favoriser la production de substances de croissance signalée par CHOLLET (1965), pour tenter d'améliorer les germinations. Ajoutons cependant que chez les choux où il existe précisément des problèmes d'incompatibilité, ROBERTS *et al.* (1983) n'ont pas constaté de meilleurs taux de germination ni d'inhibition spécifique dans les milieux présentant des stigmates avec de l'allo-pollen compatible par rapport à ceux ayant de l'auto-pollen incompatible. Par contre, FERRARI & WALLACE (1975) observent de leur côté, sur chou également, une diminution du taux de germination avec de l'auto-pollen incompatible quand ils augmentent le nombre de stigmates dans le milieu.

Pour améliorer le taux de germination des grains de pollen, il y aurait peut-être aussi à tenir compte de la densité des grains de pollen déposés dans les milieux qui semble, d'après SAVELLI & CARUSO (1940) ; FERRARI & WALLACE (1975) et ROBERTS *et al.* (1983), jouer un rôle important sur la stimulation mutuelle à la germination. Mais nous n'avons pas vérifié cet effet, on s'est contenté seulement, pour les besoins de nos essais, de déposer dans les milieux de germination des grains de pollen suffisamment nombreux.

4 — En ce qui concerne la durée de l'aptitude à germer du pollen de colza, on peut considérer qu'elle est très courte. C'est en effet, immédiatement après la déhiscence des anthères, qui suit d'ailleurs de très près l'anthèse de la fleur chez le colza, que l'aptitude à germer du pollen est maximale dans les conditions de nos essais. C'est donc à ce stade précis de la vie de la fleur

que les chances d'obtenir du pollen apte à polliniser sont les plus grandes. Les taux de germination régissent ensuite assez rapidement au fur et à mesure du vieillissement de la fleur. Au stade de la « chute des pétales », 3^e ou 4^e j après l'anthèse, la perte de la faculté germinative du pollen est totale ou presque.

Il reste à préciser certains aspects techniques pour essayer d'améliorer encore davantage la germination « *in vitro* » du pollen de colza. Ainsi, nous ne connaissons pas avec précision l'effet de l'addition dans le milieu d'autres produits tampons utilisables et différents du tris pour modifier le pH sur les taux de germination. Nous ne connaissons pas non plus l'effet de la température d'incubation et de celui des conditions de milieu externes (température, humidité relative, sol, fumure, etc.) sur l'aptitude à germer et la longévité du pollen.

Nous pensons que l'intérêt pratique de notre travail est double :

1) pour avoir une meilleure approche de la valeur pollinisatrice du pollen de colza, il était utile de s'intéresser à l'évolution dans le temps de son aptitude à germer. Ce travail est d'ailleurs un préalable à l'étude de l'aptitude à germer du pollen prélevé sur le corps des insectes pollinisateurs sachant qu'il existe dans les sécrétions salivaires des abeilles domestiques (*Apis mellifica* L.), notamment, des constituants qui ont la faculté d'inhiber le pouvoir germinatif du pollen (MAURIZIO, 1960). Cette étude pourrait aussi concerner du pollen conservé au froid, dans le cas de la création d'une banque de pollen de lignées diverses dont l'importance agronomique a déjà été définie par DUPLAN & DUMAS (1984). Elle pourrait également concerner le stockage de grosses quantités de pollen nécessaires lors de pollinisation dirigée manuelle ou mécanique par distributeurs de pollen.

2) Du point de vue agronomique, cette étude permet aux sélectionneurs de colza, de disposer d'un outil désormais fiable et reproductible pour contrôler avec plus de précisions la qualité germinative du pollen des lignées étudiées et en particulier celles utilisées pour la production de semences hybrides F1 (lignée partiellement mâle-stérile comme le type BRONOWSKI, ou restauration partielle, pour le colza par exemple). Elle complèterait, en tout cas, avantageusement les déterminations limitées habituellement à la viabilité du pollen par des techniques cytologiques de coloration. Dans toutes opérations de pollinisation manuelle (auto-pollinisations en lignées pures ou allo-pollinisations), cette étude confirme enfin l'intérêt qu'il y a à tenir compte de l'âge des fleurs et d'utiliser, pour une meilleure efficacité, du pollen prélevé à l'anthèse. Il faut remarquer que ce test permet de contrôler la qualité germinative du pollen mais n'a malheureusement qu'une valeur indicative dans le cadre d'une production de semences où bien d'autres éléments entrent en jeu.

Reçu le 11 février 1986.
Accepté le 2 mars 1987.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bar-Shalom D., Mattsson O.**, 1977. Mode of hydration, an important factor in the germination of trinucleate pollen grains. *Bot. Tidsskrift*, **71**, 245-251.
- Brewbaker J. L.**, 1957. Pollen cytology and incompatibility systems in plants. *J. Hered.*, **48**, 217-277 (Cité par DUMAS, 1984).
- Brun H., Bautreis P.**, 1985. Apparition et évolution des symptômes de *Sclerotinia sclerotiorum* sur colza en fonction du seuil et des séquences d'humidité relative de l'air. C. R. des 1^{res} journées d'études sur les maladies des plantes, **2**, Paris, 409-416.
- Charpentier J. P., Bonnet-Masimbert M.**, 1983. Influence d'une réhydratation préalable sur la germination « *in vitro* » du pollen de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) après conservation. *Ann. Sci. For.*, **40**, 309-317.
- Chauvin R.**, 1968. Action physiologique et thérapeutique des produits de la ruche. In « *Traité de Biologie de l'Abeille* », Vol. **3**, Masson, Paris, 116-154.
- Chollet P.**, 1965. *Etude de la fécondation et de la fructification chez le poirier*. Thèse Fac. Sci. Univ. Rennes, 536 p.
- Deysson G.**, 1963. *Cours de botanique générale*. II.1 : *organisation et classification des plantes vasculaires*. SEDES, Paris, 346 p.
- Dumas C.**, 1984. De l'ovule à la graine : bases cytologiques et physiologiques de la fécondation. In « *Pollinisation et productions végétales* », I.N.R.A., Paris, 664 p.
- Dumas C., Clarke A. E., Knox R. B.**, 1984a. La fécondation des fleurs. *La Recherche*, **161**, 1518-1526.
- Dumas C., Duplan J. C., Gaude T., Said C.**, 1984b. Cytologie et physicochimie, deux approches complémentaires pour tester la viabilité pollinique. *C. R. du V^e Symp. Intern. sur la Pollinisation*, **21**, I.N.R.A., Paris, 415-421.
- Duplan J. C., Dumas C.**, 1984. Viabilité pollinique et conservation du pollen. In « *Incompatibilité pollinique et Amélioration des Plantes* ». ENSA, Rennes, 40-50.
- Ferrari T. E., Wallace D. H.**, 1975. Germination of *Brassica* pollen and expression of incompatibility « *in vitro* ». *Euphytica*, **24**, 757-765.
- Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y.**, 1970. Evaluation of pollen viability by induced fluorescence intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.*, **45**, 115-120.
- Hodgkin T.**, 1983. A medium for germinating *Brassica* pollen « *in vitro* ». *Cruciferae Newsletter*, **8**, 63-62.
- Hodgkin T., Marr A., Wiseman E.**, 1982. « *In vitro* » germination of *Brassica oleracea* pollen. *Cruciferae Newsletter*, **7**, 43-44.
- Knox R. B.**, 1979. *Pollen and allergy*. *Studies in Biology*, Arnold, Londres.
- Langeron M.**, 1949. *Précis de microscopie*, Masson, Paris, 1430 p.
- Maurizio A.**, 1960. Pollenkeimung-hemmende Stoffe im Körper der Honigbiene. *Atti ufficiali, XVII Cong. Internaz. Apicoltori*, Imola, **2**, 23-25.
- Roberts I. N., Gaude T. C., Harrod G., Dickinson H. G.**, 1983. Pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea* a new pollen germination medium and its use in elucidating the mechanism of self incompatibility. *Theor. Appl. Genet.*, **65**, 3, 231-238.
- Savelli R., Caruso C.**, 1940. Stimulation mutuelle dans la germination des grains de pollen de *Nicotiana*. *C. R. Acad. des Sci.*, Paris, **210**, 184-186.
- Shivanna K. R., Heslop-Harrison J.**, 1981. Membrane state and pollen viability. *Ann. Bot.*, **47**, 759-770.
- Stanley R. G., Linskens H. F.**, 1974. *Pollen : biology, biochemistry, management*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 307 p.