QUALITE REPRODUCTRICE DU POLLEN DE *C. MELO*

Pour que la reproduction des Angiospermes se déroule correctement, il est nécessaire que le pollen possède une bonne qualité reproductrice. Cette qualité recouvre deux aspects, la qualité physiologique du pollen en tant que microorganisme et sa capacité à accomplir la totalité du programme de reproduction mâle (Jahier, 1992).

Ainsi, pour que le cycle de reproduction mâle s'accomplisse convenablement, le pollen doit en premier lieu être viable lorsqu'il est libéré de l'anthère et doit posséder une bonne longévité, c'est-à-dire rester viable suffisamment longtemps jusqu'à atteindre un stigmate conspécifique (Dafni and Firmage, 2000). Ensuite, le pollen doit être capable de germer sur le stigmate et produire un tube pollinique qui atteigne un ovule (Mayer and Gottsberger, 2000). Enfin, il doit libérer des gamètes capables de féconder l'oosphère et les noyaux polaires, ce qui sera appelé dans la suite de ce travail son aptitude à féconder.

L'ensemble de ces caractéristiques est regroupé sous le terme de qualité reproductrice que certains auteurs englobent sous le terme de viabilité du pollen (Dafni and Firmage, 2000). Dans le présent travail, la qualité reproductrice du pollen sera composée de sa viabilité, de sa capacité à germer et de son aptitude à féconder.

Selon Dafni et Firmage (2000), la qualité reproductrice du pollen dépend de nombreux facteurs qui peuvent être intrinsèques, morphologiques ou environnementaux, comme la microsporogenèse, le métabolisme du pollen, la morphologie des fleurs et des anthères, la période d'anthèse, le vecteur pollinisateur, les sécrétions d'insectes, l'humidité relative et la température.

En fonction de la composante à tester, la qualité reproductrice du pollen peut être évaluée par différentes méthodes. Celles-ci permettent d'évaluer l'effet d'un facteur donné ou de s'assurer de la qualité du pollen avant la pratique de pollinisations manuelles (Heslop-Harrison *et al.*, 1984 ; Kearns et Inouye, 1993).

Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps les méthodes d'évaluation de la qualité reproductrice adaptées à notre modèle végétal et à nos conditions d'expérimentation. Dans un deuxième temps, nous étudierons l'évolution de la qualité reproductrice du pollen de *C. melo* au cours de l'anthèse. Et enfin, nous analyserons l'effet du transport par les insectes sur cette qualité reproductrice.

I. Méthodes d'évaluation de la qualité reproductrice du pollen

1.Introduction

Plusieurs approches ont été décrites pour tester chaque composante de la qualité reproductrice du pollen (viabilité, capacité à germer et aptitude à féconder). Pour évaluer la viabilité, il est possible de mesurer la respiration ou la conductivité chimique des lessivats de pollen (rarement utilisées), le contenu en proline ou d'utiliser des tests de coloration. La capacité à germer du pollen, quant à elle, peut être évaluée par des tests de germination *in vivo* ou *in vitro*. Enfin, l'aptitude à féconder est évaluée en mesurant la grenaison, c'est-à-dire la capacité du pollen à induire la mise en place d'une graine (Dafni and Firmage, 2000).

1.1.Les méthodes d'évaluation de la viabilité du pollen

Les méthodes d'évaluation de la viabilité du pollen sont des mesures dites indirectes car elles reposent sur la corrélation entre la viabilité d'une cellule et certaines de ses caractéristiques physiologiques et physiques (Heslop-Harrison *et al.*, 1984 ; Kearns and Inouye, 1993). Il existe plusieurs tests d'évaluation de la viabilité comme les colorations de la cellule végétative ou les tests d'activités enzymatiques (Kearns and Inouye, 1993).

Les méthodes de coloration du cytoplasme de la cellule végétative comme la coloration au lactophénol ou au carmin acétique se basent sur le concept que les grains de pollen exempts de cytoplasme sont morts (Nepi and Franchi, 2000). Ces méthodes surestiment la viabilité du pollen car elles colorent les grains viables possédant un cytoplasme, mais également les grains morts (Käpylä, 1991). La coloration d'Alexander (1969) met en évidence la présence de cellulose et d'un protoplasme. Elle est basée sur l'hypothèse que la présence d'un protoplasme rend compte de la viabilité d'un grain de pollen (Kearns and Inouye, 1993). Elle permet selon Barrow (1983) de distinguer les grains de pollen qui avortent tôt car ils ne possèdent pas de protoplasme. En revanche, ceux qui avortent à un stade proche de la maturité ne sont pas détectés (Pline *et al.*, 2002).

Les méthodes enzymatiques utilisent des réactions colorées induites par l'activité métabolique dans le grain de pollen. Ces méthodes reposent sur l'hypothèse que si l'activité est présente, la réaction colorée a lieu et par conséquent que le pollen est viable (Nepi and Franchi, 2000).

Les premières méthodes enzymatiques étaient basées sur les sels de tétrazolium qui changent de couleur lorsqu'ils sont réduits par les enzymes respiratoires des mitochondries. D'autres méthodes permettent de détecter la présence de déshydrogénases, de β-galactosidases ou encore de myélopéroxydases (Rodriguez-Riano and Dafni, 2000). La méthode enzymatique la plus couramment utilisée est celle proposée par Heslop-Harrison et Heslop-Harrison (1970) et modifiée par Shivanna et Heslop-Harrison (1981), la réaction fluorochromatique (FCR). Lors de cette réaction, le diacétate de fluorescéine non-fluorescent et apolaire pénètre dans le grain de pollen où il est hydrolysé par des estérases en fluorescéine, composé fluorescent et polaire retenu dans la cellule par la membrane plasmique (Figure 25). Cette méthode évalue deux caractères : l'intégrité membranaire et l'activité estérasique. Son avantage est de différencier très facilement et rapidement les grains viables des grains non-viables (Pline *et al.*, 2002). Elle peut cependant sous-estimer la viabilité lorsque le pollen est déshydraté (Stone *et al.*, 1995).

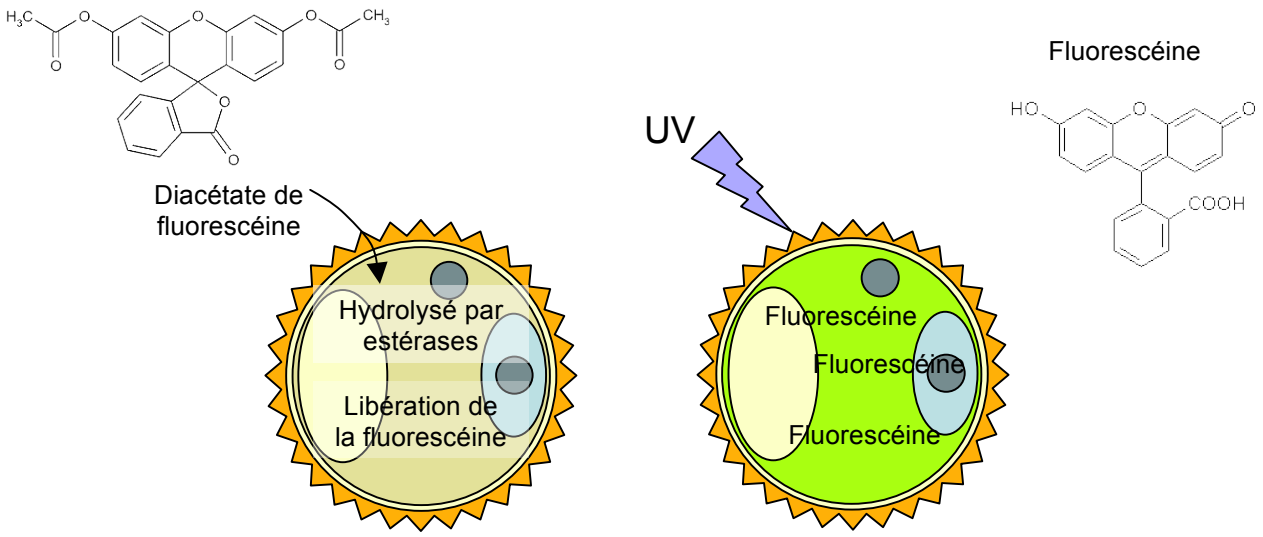

Figure 25 : Principe de la réaction fluorochromatique. Le diacétate de fluorescéine, apolaire, pénètre dans le grain de pollen où il est hydrolysé par des estérases qui libèrent de la fluorescéine. Cette molécule polaire s'accumule dans la cellule végétative car elle est retenue par la membrane plasmique. Après excitation en lumière ultra-violette, la fluorescéine émet une fluorescence verte.

1.2.Les méthodes d'évaluation de la capacité à germer du pollen

La capacité à germer du pollen se mesure en calculant le pourcentage de grains de pollen germés dans un échantillon (Nepi and Franchi, 2000). Pour cela, les grains de pollen sont mis

à germer *in vivo* sur un stigmate réceptif conspécifique ou *in vitro* sur un milieu de germination adapté.

La méthode de germination *in vivo* consiste à compter le nombre de grains de pollen qui ont germé par rapport au nombre total de grains déposés sur le stigmate. Pour cela, on peut (i) compter le nombre de tubes polliniques présents dans le style et visualisés grâce à des colorants tels que le bleu d'aniline et le rapporter au nombre total de grains de pollen (Chacoff *et al.*, 2008 ; Huang *et al.*, 2004 ; Adaniya, 2001 ; Nepi and Franchi, 2000) ou (ii) compter le nombre de grains ancrés dans le stigmate grâce au tube pollinique et le rapporter au nombre total de grains (Mayer and Gottsberger, 2000).
La germination *in vitro* est une technique beaucoup plus rapide que la germination *in vivo*. Elle consiste à immerger des grains de pollen dans une solution germinative ou à les déposer sur un milieu solide et à les observer sous microscope pour visualiser les tubes polliniques formés (Brewbaker and Kwack, 1963). Cette méthode nécessite cependant un important travail d'adaptation du milieu germinatif à l'espèce considérée, plus particulièrement en ce qui concerne la source de carbone. En effet, la concentration en saccharose nécessaire à la germination *in vitro* du pollen varie entre 2% et 40% en fonction des espèces. L'optimum en saccharose doit être déterminé pour chaque espèce à l'aide d'essais de germination à différentes concentrations. Une concentration trop faible en saccharose entraîne un faible taux de germination et des tubes polliniques peu développés alors qu'une concentration trop élevée provoque l'éclatement des tubes polliniques (Kearns and Inouye, 1993). Pour beaucoup d'espèces, de l'acide borique et du calcium sont nécessaires à la germination du pollen. L'acide borique normalement apporté par le style et le stigmate chez ces espèces facilite la consommation des sucres et joue un rôle dans la production de pectine dans le tube pollinique (Richards, 1986 cité par Kearns and Inouye, 1993). Le calcium présent à la surface de certains grains de pollen est impliqué dans la synthèse de pectine et dans le contrôle des conditions osmotiques (Kearns and Inouye, 1993).

La germination *in vitro* fournit un système expérimental contrôlé, permet une importante répétabilité et est rapide à mettre en place. Cependant, elle ne reproduit pas complètement la croissance *in vivo* (Taylor and Hepler, 1997). En effet, avec un milieu de germination hautement optimisé, les tubes pollinques formés n'atteignent que 30 à 40% de la longueur des tubes développés *in vivo* et des anomalies structurales sont fréquemment observées. De plus,

l'interaction dynamique existante entre le pollen et le pistil reste impossible à reproduire *in vitro* (Taylor and Hepler, 1997).

En revanche, la germination *in vivo* qui permet d'obtenir des résultats proches de la réalité demande un plus grand temps de manipulation. De plus, elle nécessite un contrôle précis du nombre de grains déposés sur les stigmates et de la manière dont ils sont déposés pour être reproductible. En effet, ce type de germination est affecté par des effets de masse et de compétition entre grains (Nepi and Franchi, 2000) ou par des réactions d'incompatibilité avec le pistil (Stanley and Linskens, 1974).

1.3.L'évaluation de l'aptitude à féconder

Le test qui évalue la capacité à féconder du pollen est la mesure de la grenaison. Il consiste à déposer du pollen sur un stigmate conspécifique réceptif et à déterminer le nombre de graines produites (Kearns and Inouye, 1993). Cette méthode donne un résultat plus qualitatif que quantitatif de l'aptitude à féconder du pollen (Shivanna and Johri, 1989). En effet, la grenaison ne dépend pas uniquement de la qualité reproductrice du pollen. La maturité des ovules, la réceptivité du stigmate, les réactions d'incompatibilité déterminées par le génotype femelle sont autant de facteurs pouvant interférer avec le test de fécondité du pollen (Heslop-Harrison *et al.*, 1984 ; Knox *et al.*, 1986). De ce fait, nous avons choisi de ne pas mesurer l'aptitude à féconder du pollen.

1.4.Variabilité de ces méthodes

Afin d'apprécier au mieux la qualité reproductrice du pollen, il est nécessaire d'utiliser plusieurs tests simultanément qui évaluent chaque composante de la qualité (Dafni and Firmage, 2000). Les différents tests utilisés pour estimer une de ces composantes peuvent donner des résultats contradictoires en fonction des espèces et des génotypes (Shivanna and Rangaswamy, 1992) et ne correspondent pas toujours à la qualité reproductrice réelle du pollen (Mayer and Gottsberger, 2000). Il est donc souhaitable de tester plusieurs méthodes pour choisir la meilleure pour chaque composante et pour une espèce donnée (Dafni and Firmage, 2000).

Dans cette étude, nous avons déterminé les méthodes les plus adéquates pour évaluer la viabilité et la capacité à germer du pollen de *C. melo*. Nous avons comparé la coloration d'Alexander (1969) et la FCR (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1970) pour définir le

test de viabilité le plus adapté à notre modèle végétal. Deux méthodes de germination *in vitro*, la première dérivée de Dumas de Vaulx (1992) et Susin et Alvarez (1997) et la seconde proposée par Matlob et Kelly (1973) ont été testées. Enfin nous avons vérifié que les méthodes d'extraction du pollen n'altéraient pas sa qualité.

2.Matériels et méthodes

2.1.Matériel végétal

Des graines de melon (*C. melo* L. var. *cantalupensis*) var. Thorgal ® (Nunhems) ont été semées individuellement en pots et placées en chambre de culture (photopériode 16h, température 26°C) jusqu'au stade deux vraies feuilles. Les plantes ont par la suite été repiquées sous tunnel. Les plantes ont été arrosées deux fois par semaine et régulièrement taillées.

2.2.Sources de pollen

Cette étude de la qualité reproductrice du pollen de *C. melo* a été réalisée en utilisant soit du pollen provenant directement des anthères soit du pollen ayant été préalablement extrait.

Pollen provenant des anthères

Des fleurs mâles ont été récoltées juste avant utilisation. Leurs anthères ont été excisées. Les cinq anthères d'une même fleur constituaient une unité statistique (US).

Pollen extrait artificiellement

Les anthères de fleurs mâles venant d'être récoltées ont été excisées, puis placées dans des boules à thé. Le pollen a ensuite été extrait soit mécaniquement, soit chimiquement. Pour l'extraction mécanique, les boules à thé contenant les anthères ont été soumises à des vibrations au-dessus de coupelles dans lesquelles le pollen a été récupéré. L'extraction chimique a été réalisée en immergeant chaque boule à thé dans 5 ml de pentane. Le pollen ainsi obtenu a été utilisé après évaporation totale de ce solvant (Figure 26).

Après ces extractions, la manipulation du pollen a été conduite en le transférant sur des embouts de coton-tige. Ces derniers ont été utilisés comme supports inertes en vue de prélever des quantités comparables de pollen à partir des différents lots. La mise en contact du pollen extrait artificiellement avec ces supports était la même quel que soit le mode d'extraction. Les embouts de coton-tige ont été placés dans les coupelles contenant le pollen extrait puis mis en contact par vibration. Chaque embout constituait une US pour les tests.

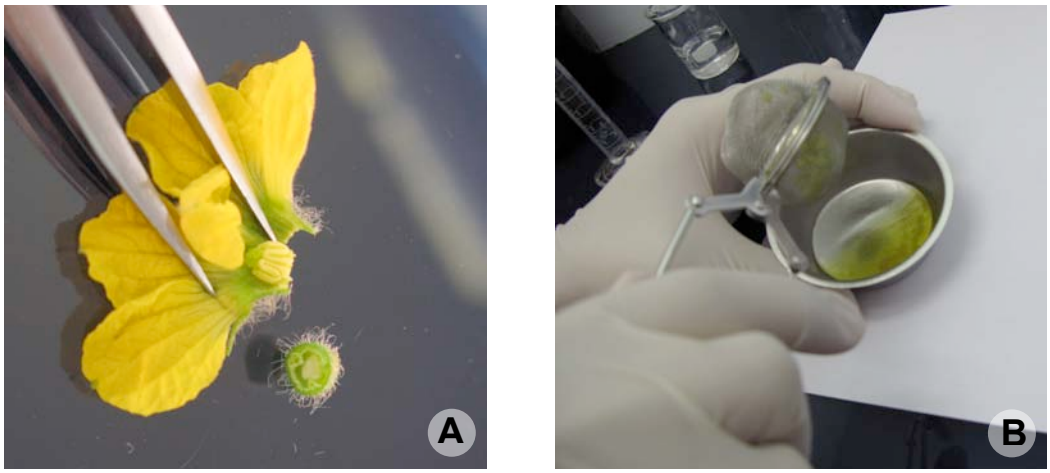

Figure 26 : Extraction chimique du pollen. Les anthères des fleurs sont excisées (**A**) puis placées dans des boules à thé et trempées dans le pentane (**B**).

2.3.Evaluation de la viabilité

a.FCR

Une solution-mère de diacétate de fluorescéine (DAF) a été préparé quotidiennement en dissolvant 2 mg/ml d'acétone et conservée à l'obscurité et à température ambiante. Pour chaque test, une solution de travail a été préparée extemporanément en diluant 2,5 µl de la solution-mère de DAF dans 1 ml de saccharose à 15% (p/v). Chaque US était constituée du pollen provenant soit des cinq anthères d'une même fleur, soit d'un embout de coton-tige dans le cas de pollen extrait artificiellement. Chaque US a été introduite dans un tube contenant 1 ml de solution colorante. Le tube a été agité pendant quelques secondes pour mettre en suspension le pollen. Après 15 minutes de réaction à l'obscurité et à température ambiante, 20 µl ont été prélevés et déposés sur une lame de microscope puis recouverts d'une lamelle. Les lames ont été ensuite observées sous microscope à épifluorescence (avec filtre d'émission à 522 nm et filtre d'excitation à 488 nm). Pour chaque US, 100 grains de pollen

ont été examinés et comptés viables ou non viables. Seuls les grains de pollen ayant une fluorescence brillante et uniforme ont été considérés viables.

b.Coloration d'Alexander

La solution colorante a été préparée selon la formulation d'Alexander (1969) en mélangeant 20 ml d'éthanol grade Reagent, 2 ml de vert de malachite (1% dans de l'éthanol à 95°), 50 ml d'eau distillée, 40 ml de glycérol, 10 ml de fuchsine acide (1% dans de l'eau distillée), 1 g de phénol et 2 ml d'acide lactique. Cette solution colorante a été stockée, à l'obscurité et à température ambiante, 3 semaines avant utilisation. Pour chaque test, le pollen a été mis en suspension en plongeant une US dans 500 µl de solution colorante. L'ensemble a été soniqué 30 secondes, puis centrifugé 40 secondes pour sédimenter le pollen. Une goutte (20 µl) prélevée dans le fond du tube a été déposée sur lame. La lame a été chauffée par cinq passages au-dessus d'une flamme et a été ensuite recouverte d'une lamelle. Après cinq minutes de réaction entre le pollen et la coloration, les lames ont été observées sous microscope. Pour chaque US, 100 grains de pollen ont été analysés, les grains de pollen colorés en violet foncé étaient considérés comme viables alors que ceux colorés en vert clair étaient considérés comme non viables.

2.4.Evaluation de la capacité à germer

Les conditions optimales de germination *in vitro* variant d'une espèce et même d'un génotype à l'autre, nous avons choisi de comparer les conditions d'expérimentation utilisées pour du pollen de *C. melo* par Matlob et Kelly (1973) et par Susin et Alvarez (1997).
Le tableau 3 présente la composition des milieux germinatifs ainsi que les conditions expérimentales des deux méthodes testées.

Méthode	Milieu germinatif		Conditions d'incubation	
	Saccharose (p/v)	Acide borique	Température	Durée
1 – dérivée de Dumas de Vaulx (1992) et de Susin and Avarez (1997)	15%	5 $mg.l^{-1}$	25°C	1h
2 – Matlob and Kelly (1973)	20%	5 $mg.l^{-1}$	32°C	2h

Tableau 3 : Compositions des milieux germinatifs et conditions d'expérimentation des deux méthodes de germination *in vitro* testées.

Pour chaque méthode, une US a été placée dans un tube contenant 500 µl de milieu germinatif. Après incubation, 2 gouttes de carmin acétique à 5% ont été rajoutées. Après 10 min de coloration, 20 µl de solution ont été prélevés et montés entre lame et lamelle. Cent grains de pollen ont été analysés par lame. Un grain de pollen était considéré germé quand la longueur du tube pollinique était supérieure au diamètre du grain (Figure 27).

Figure 27 : Germination *in vitro* du pollen de *C. melo*. Contrairement aux grains de pollen non germés (NG), les grains de pollen considérés comme germés (G) présentent un tube pollinique dont la longueur est supérieure au diamètre du grain.

2.5.Analyse statistique

Les données ont généralement été comparées avec un test de Kruskal-Wallis. Si ce dernier révélait une différence significative, elles étaient ensuite comparées deux à deux avec un test de Wilcoxon intégrant la correction de Holm. Dans quelques cas, un test t de Student a été utilisé. L'ensemble de ces tests a été fait sous le logiciel R.

3.Résultats

3.1.Evaluation de la viabilité du pollen

a.Amélioration de la FCR

Une étape d'amélioration de la FCR a été nécessaire en 2009 car cette méthode utilisée sur melon par Vaissière *et al.* (1996) et pendant notre expérimentation de 2008 ne donnait plus des résultats satisfaisants (résultats non montrés).

La FCR étant connue pour sous-estimer la viabilité lorsque le pollen est déshydraté, la première piste que nous avons exploré afin d'améliorer l'évaluation de la viabilité a été la préhydratation du pollen.

La préhydratation des fleurs entières en chambre humide pendant 1h à 32°C a permis d'augmenter la viabilité (41,15% contre 26,8% sans préhydratation ; KW, H=6,200, df=1, p=0,013 ; Figure 28A). Cependant, les valeurs étaient toujours inférieures aux valeurs obtenues en 2008. De plus, la forte variabilité enregistrée ne permettait pas la validation de cette méthode de préhydratation.

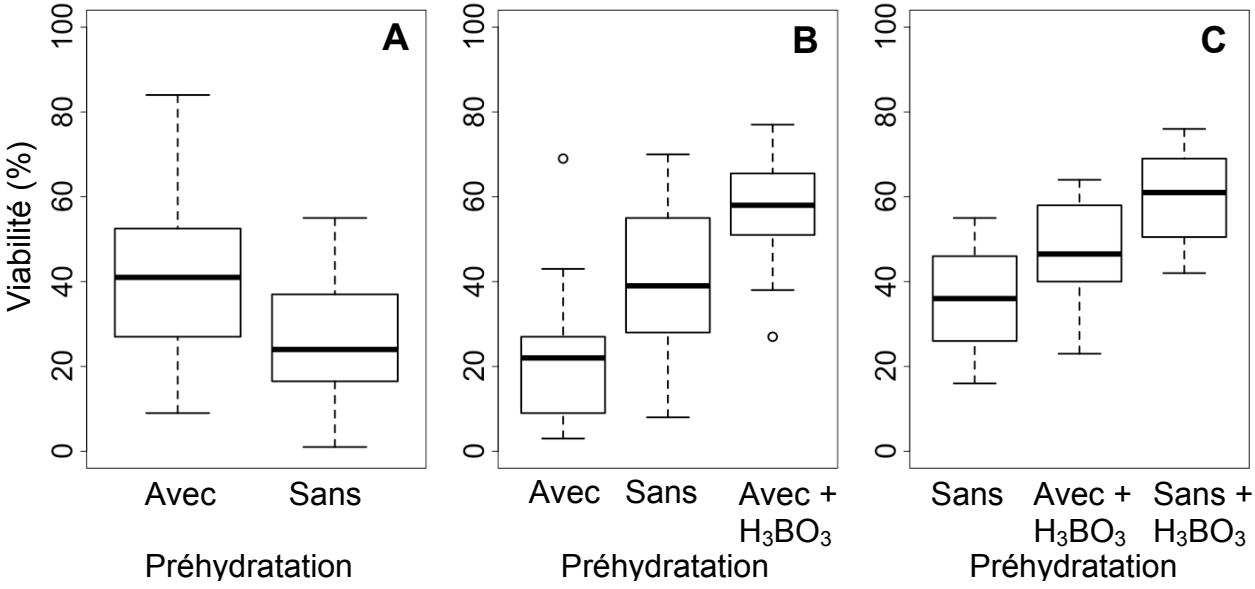

Figure 28 : Effet de la préhydratation sur l'estimation de la viabilité du pollen. Différentes méthodes ont été testées: **A** préhydratation des fleurs entières en chambre humide pendant 1h à 32°C, n=20 ; **B** préhydratation du pollen en solution réactionnelle pendant 1h à 32°C avec ou sans ajout d'acide borique (H_3BO_3) dans la solution, n=20 ; **C** préhydratation du pollen en solution réactionnelle pendant 2h à 32°C avec ou sans ajout d'acide borique dans la solution, n=20. Trait = médiane, boîte = 25%-75%, moustaches = 1^{er}-9^{e} déciles, cercles = valeurs extrêmes.

Une autre méthode de stabilisation du niveau hydrique du pollen a, par la suite, été testée. Pour cela, le pollen a été réhydraté directement dans la solution réactionnelle de la FCR [saccharose à 15% (p/v)] pendant 1h à 32°C. Cette méthode étant inspirée de la technique de germination *in vitro*, nous avons testé en parallèle l'ajout d'acide borique à 5mg.l^{-1} dans la solution réactionnelle. Les résultats présentés dans la Figure 28B montrent que les pourcentages de viabilité estimés après préhydratation en solution standard était plus faible que sans préhydratation (test post-hoc, p=0,0026). En revanche, l'ajout d'acide borique a

permis d'obtenir une viabilité estimée plus importante (test post-hoc, p=0,0026). Ce résultat inattendu nous a conduit à déterminer si l'effet constaté était dû simplement à la présence d'acide borique dans la solution ou s'il y avait une interaction avec la préhydratation. Nous avons alors mis en oeuvre une expérimentation pour tester ces deux modalités (Figure 28C). Ceci a révélé que la viabilité du pollen était plus importante en présence d'acide borique (KW, H=24,264, df=2, $p=5{,}38.10^{-6}$) et que, dans ce cas, la préhydratation ne permettait pas d'augmenter la viabilité (59,9% sans préhydratation contre 47,1% avec ; test post-hoc, p=0,0029).

Pour s'assurer de cet effet de l'acide borique comme élément stabilisant la viabilité du pollen chez *C. melo*, il a été vérifié au cours de cinq répétitions (Figure 29A). Il en est ressorti que même si la viabilité estimée n'était pas constante, elle était toujours supérieure lors de l'ajout d'acide borique (test t, t=-29,44, $p<2{,}2.10^{-16}$).

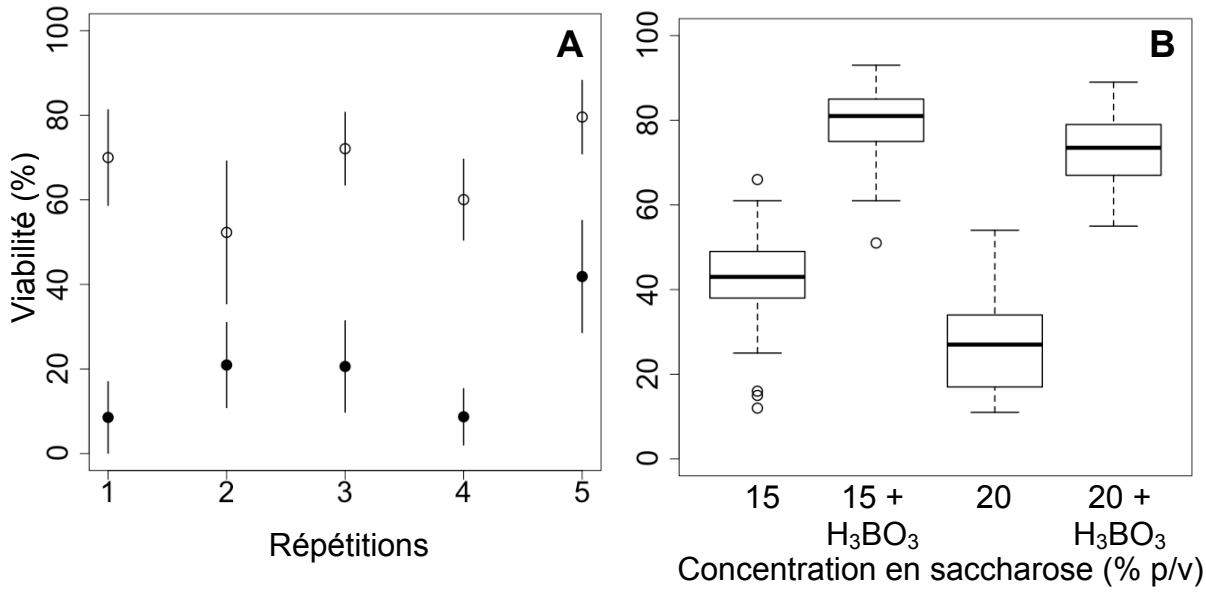

Figure 29 : Effet de l'acide borique et de la concentration en saccharose sur l'estimation de la viabilité. **A** Viabilité moyenne du pollen estimée avec (○) ou sans (●) acide borique dans la solution réactionnelle, les barres représentent l'écart-type, répétitions 1 et 2 : n=20, répétitions 3, 4 et 5 : n=30. **B** Différentes concentrations en saccharose supplémentées ou non d'acide borique ont été testées, n=30. Trait = médiane, boîte = 25%-75%, moustaches = 1er-9e déciles, cercles = valeurs extrêmes.

L'acide borique ayant un effet sur la métabolisation des sucres, nous avons choisi de tester l'effet d'une augmentation de la concentration en saccharose seule ou couplée avec de l'acide borique à 5 $mg.l^{-1}$ sur l'estimation de la viabilité du pollen (Figure 29B). Nos résultats ont montré que l'augmentation de la concentration en saccharose [de 15% à 20% (p/v)] diminuait la viabilité que ce soit en présence ou en absence d'acide borique (test post-hoc, 15% de

saccharose avec ou sans H_3BO_3, $p=9{,}2.10^{-5}$; 20% de saccharose avec ou sans H_3BO_3, p=0,0028).

Tenant compte de ces résultats, la méthode que nous avons adoptée pour la suite des expérimentations de 2009 a été la solution réactionnelle composée de saccharose à 15% (p/v) supplémentée d'acide borique à 5 $mg.l^{-1}$.

b.Comparaison de la coloration d'Alexander et de la FCR

Afin de vérifier que la FCR était la méthode la plus adéquate pour l'évaluation de la viabilité du pollen de *C. melo* dans notre contexte expérimental, nous l'avons comparée à la coloration d'Alexander.

Cette étude comparative a montré que la viabilité estimée par la coloration d'Alexander était plus faible que par la FCR (52,4% contre 72,1% ; KW, H=18,852, df=1, $p=1{,}4.10^{-5}$; Figure 30).

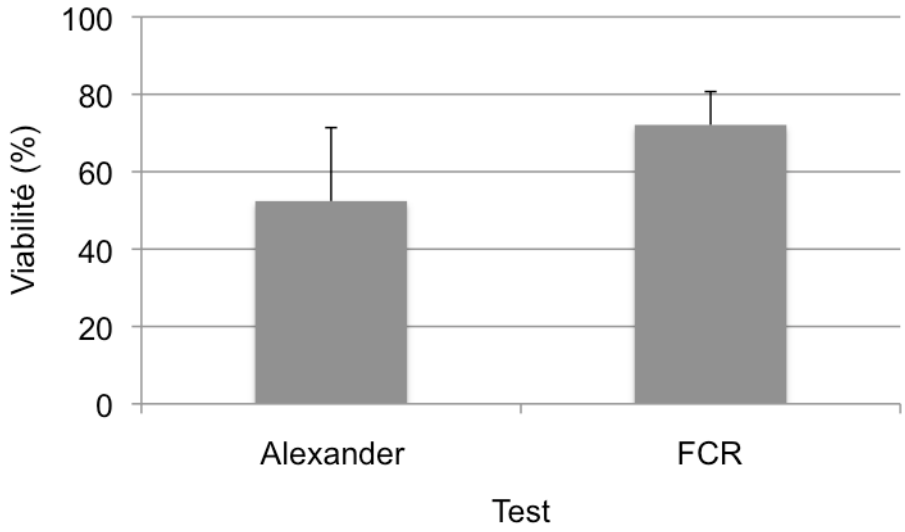

Figure 30 : Comparaison de la viabilité du pollen estimée par la coloration d'Alexander ou par la réaction fluorochromatique. Les histogrammes représentent la viabilité moyenne du pollen analysé chez 30 fleurs, les barres représentent l'écart-type.

Par ailleurs, la coloration d'Alexander s'accompagnait d'une importante variabilité pouvant s'expliquer par la large gamme de coloration des grains observés qui rendait l'évaluation difficile (Figure 31). En effet, elle n'a pas permis une détermination tranchée du statut des grains de pollen. Selon cette technique, pour être considéré comme viable un grain de pollen doit présenter une coloration homogène et fuchsia du cytoplasme et à l'inverse un grain non viable doit présenter une coloration turquoise homogène de la cellulose. Or, nos observations

ont révélé que cette méthode colorait les grains de pollen dans une gamme allant du turquoise au fuchsia avec de nombreux intermédiaires (Figure 31A). La FCR, quant à elle, a permis une détermination rapide et fiable car elle colorait les grains de pollen de manière tranchée (Figure 31B).

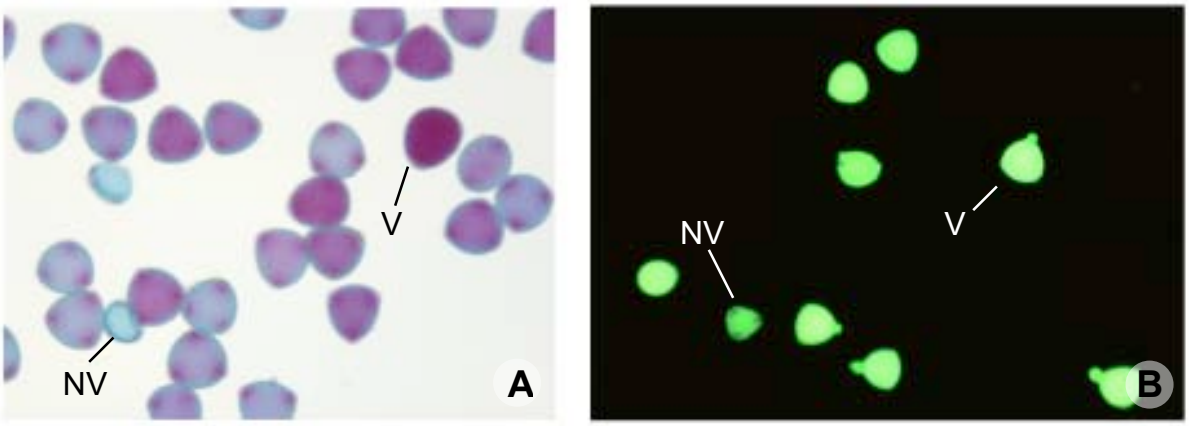

Figure 31 : Coloration des grains de pollen de melon en fonction de la méthode utilisée. Avec la coloration d'Alexander (**A**), les grains viables ont une coloration violette homogène (V) alors que les grains non viables sont turquoise (NV). Néanmoins, de nombreux grains de pollen présentent des colorations intermédiaires et sont difficiles à discriminer. Avec la réaction fluorochromatique (**B**), les grains viables fluorescent (V) alors que les non viables (NV) ne présentent qu'une faible autofluorescence due à l'exine.

3.2.Evaluation de l'aptitude à germer du pollen

L'aptitude à germer *in vitro* du pollen de *C. melo* a été testée par deux méthodes différentes au cours de trois répétitions (Tableau 4). Les tests de germination *in vitro* effectués selon la technique dérivée de Dumas de Vaulx (1992) et de Susin et Alvarez (1997) n'a permis qu'à 15,5% des grains de pollen de germer et avec une très forte variabilité au cours des répétitions. En revanche, les tests de germination *in vitro* que nous avons effectués selon la méthode de Matlob et Kelly (1973) a permis d'obtenir un taux important de germination (85,9% en moyenne) qui variait peu en fonction des répétitions.

Répétitions	Méthode 1	Méthode 2
1	34,54 ± 15,72 (11)	89,53 ± 7,48 (15)
2	6,11 ± 5,60 (10)	85,94 ± 6,52 (20)
3	3,98 ± 5,05 (10)	84,08 ± 7,87 (30)
Moyenne des répétitions	15,51 ± 17,21 (31)	85,91 ± 7,59 (65)

Tableau 4 : Estimation de l'aptitude à germer *in vitro* du pollen de *C. melo* selon deux méthodes. Méthode 1 : technique dérivée de Dumas de Vaulx (1992) et de Susin et Alvarez (1997). Méthode 2 : méthode de Matlob et Kelly (1973). Aptitude à germer moyenne ± l'écart-type enregistrée au cours de trois répétitions, nombre d'échantillons entre parenthèses.

3.3. Méthodes d'extraction et méthodes d'évaluation de la qualité reproductrice du pollen

Les expérimentations ultérieures nécessitant l'utilisation de pollen extrait artificiellement, il était essentiel de vérifier que les méthodes d'extraction n'altéraient pas la qualité reproductrice.

Les résultats ont montré que la viabilité du pollen extrait artificiellement, que ce soit chimiquement ou mécaniquement, était plus faible comparée à celle du pollen provenant directement des anthères (Figure 32). Nous avons également voulu vérifier l'effet de l'acide borique sur du pollen extrait artificiellement. Son utilisation n'a pas amélioré l'estimation de la viabilité du pollen (test post-hoc, p=0,27). Cependant, n'induisant pas non plus d'effet négatif, l'acide borique a été utilisé lors des tests ultérieurs pour qu'ils puissent être comparés aux précédents.

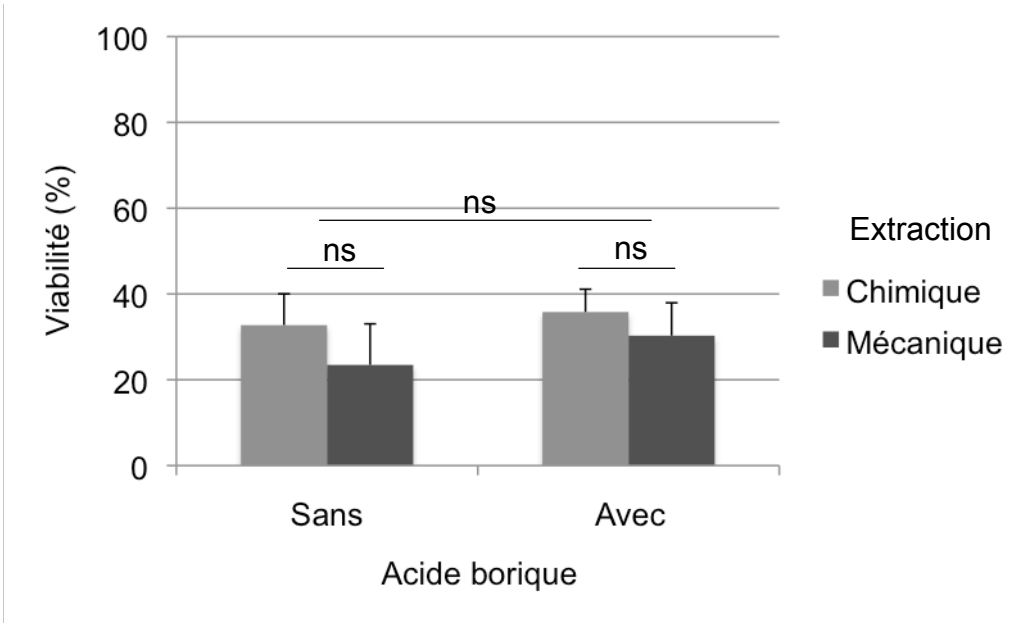

Figure 32 : Effet de l'utilisation d'acide borique sur l'estimation de la viabilité du pollen en fonction de la méthode d'extraction utilisée. Les histogrammes représentent la viabilité moyenne du pollen analysé chez 15 fleurs, les barres représentent l'écart-type, ns = différence non significative.

La longévité du pollen extrait artificiellement, c'est-à-dire le maintien de sa viabilité au cours du temps, a été évaluée par FCR (Figure 33). Il ressort que, directement après extraction, la viabilité du pollen extrait chimiquement était plus faible que celle du pollen extrait mécaniquement (test post hoc, p=0,03). Puis, suite à une, deux et quatre heures d'attente après extraction, les grains de pollen extraits par les deux méthodes présentaient des viabilités similaires. De plus, nos résultats ont montré que la viabilité du pollen extait chimiquement

était stable au cours du temps (KW, H=0,965, df=3, p=0,81), alors que celle du pollen extrait mécaniquement a diminué (H=22,062, df=3, p=6,3.10^{-5}).

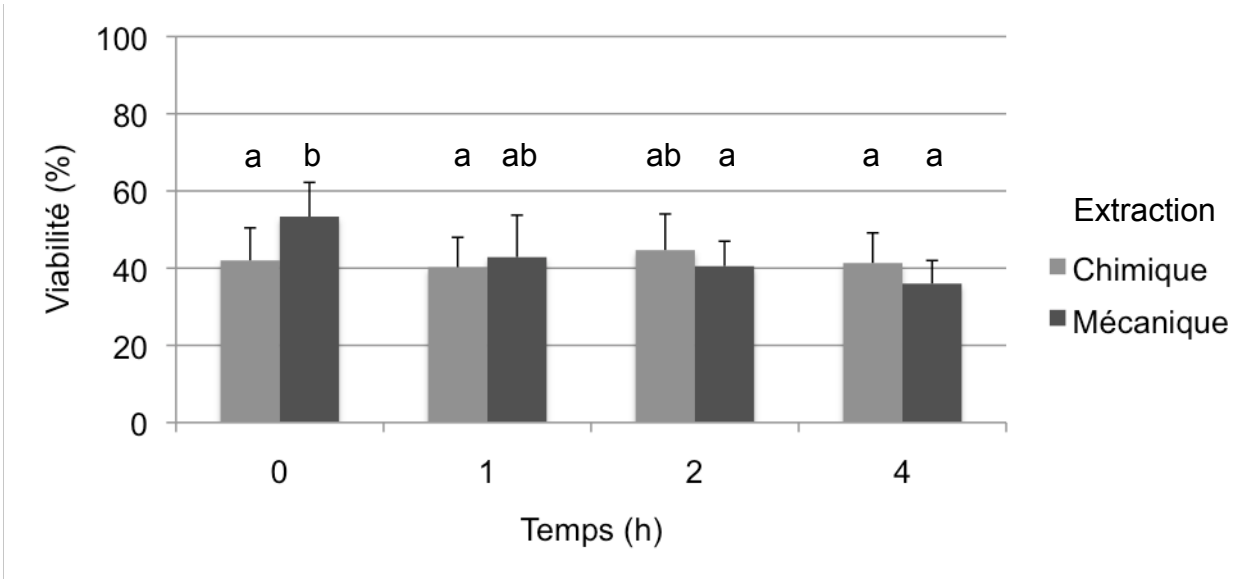

Figure 33 : Evolution de la viabilité du pollen au cours du temps en fonction du mode d'extraction. Les histogrammes représentent la viabilité moyenne du pollen analysé chez 15 fleurs, les barres représentent l'écart-type.

L'aptitude à germer du pollen extrait artificiellement a été évaluée, directement après extraction ou après différents temps d'attente (Figure 34). La méthode de germination *in vitro* utilisée a été celle testée précédemment sur le pollen provenant d'anthère. Les résultats montrent que le pollen extrait mécaniquement a germé en plus grande proportion que le pollen extrait chimiquement (test t, p=1,968.10^{-6}). Quel que soit le mode d'extraction, l'aptitude à germer du pollen était plus élevée quatre heures après extraction.

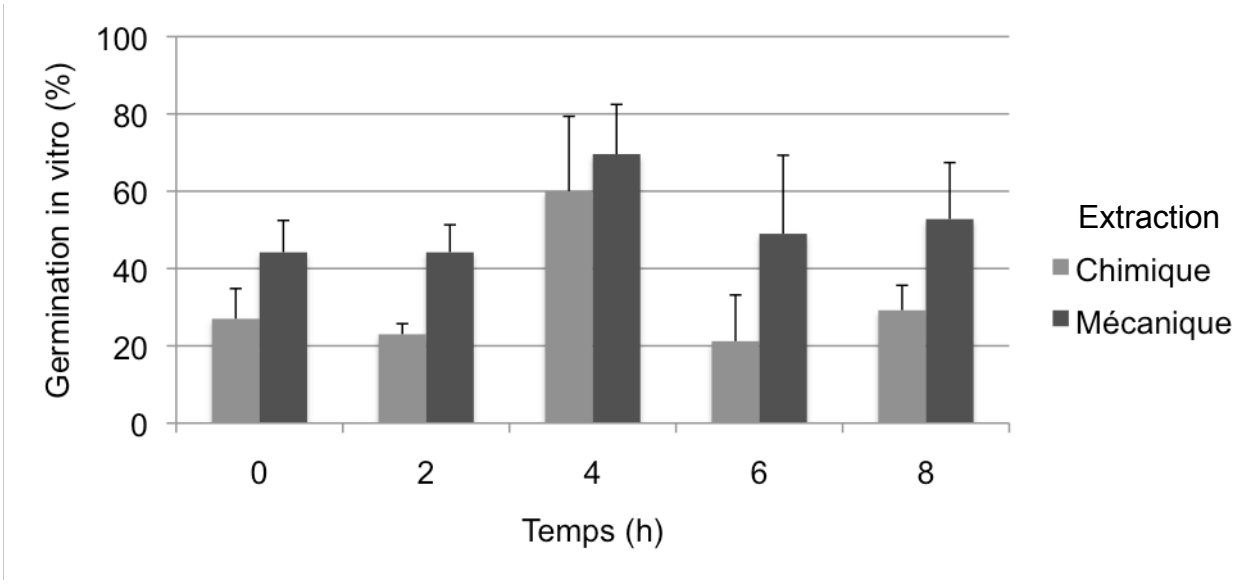

Figure 34 : Aptitude à germer *in vitro* du pollen en fonction du mode d'extraction et du temps d'attente après extraction. Les histogrammes représentent l'aptitude à germer moyenne du pollen analysé chez 5 fleurs, les barres représentent l'écart-type.

4.Discussion

La FCR est actuellement la méthode la plus utilisée pour évaluer la viabilité du pollen. Cette méthode rapide et aisée d'utilisation permet de différencier avec fiabilité un grain de pollen viable d'un grain non viable. Cependant, aux cours de nos différentes campagnes d'expérimentation, la FCR telle qu'elle était utilisée n'a plus permis une estimation fiable de la viabilité des échantillons de pollen testés. L'importante baisse de viabilité que nous avons enregistrée en 2009 pourrait être due au niveau d'hydratation du pollen. En effet, la FCR peut sous-estimer la viabilité lorsque le pollen est déshydraté car son activité enzymatique est réduite (Stone *et al.*, 1995) et la stabilité de ses membranes cellulaires est affectée (Taylor and Hepler, 1997). Cependant, le déclin apparent de viabilité dû à la déshydratation peut être modifié par une réhydratation du pollen (Stone *et al.*, 1995) à condition que les changements structuraux induits par cette déshydratation soient réversibles (Taylor and Hepler, 1997). Il a été montré chez plusieurs espèces que l'équilibration en haute humidité du pollen augmentait sa qualité reproductrice (Bar-Shalom and Mattsson, 1977 ; Shivanna and Heslop-Harrison, 1981). En revanche, chez *C. melo*, la préhydratation des fleurs entières ou du pollen uniquement testée ici n'a pas permis d'améliorer correctement l'estimation de la viabilité du pollen. Ces résultats sont concordants avec ceux de Cuny (1992) qui montraient que la

préhydratation était inefficace, voire néfaste, sur la germination *in vitro* du pollen de *C. melo*. Par contre, nous avons mis en évidence que l'ajout d'acide borique dans la solution réactionnelle améliorait hautement l'estimation de la viabilité, nous permettant d'obtenir des valeurs similaires à celles obtenues les années précédentes. A notre connaissance, aucune autre étude n'a, auparavant, souligné l'intérêt de l'utilisation de l'acide borique dans la réalisation de la FCR. L'acide borique est habituellement employé lors de la germination *in vitro* pour sa capacité à favoriser la métabolisation des sucres. Il permet, de plus, de prévenir l'éclatement du grain de pollen (Vasil, 1960 ; Visser, 1955) en régulant la pénétration de l'eau (Gauch and Dugger, 1954). Cette propriété permet vraisemblablement d'améliorer l'estimation de la viabilité en réhydratant le pollen. Pour la suite des expérimentations de 2009, la FCR a été réalisée avec une solution réactionnelle composée de saccharose à 15% (p/v) additionnée d'acide borique à 5 $mg.l^{-1}$.

Bien que la FCR soit la technique la plus communément utilisée pour estimer la viabilité du pollen et qu'elle ait déjà été utilisée sur *C. melo* (Vaissière *et al.*, 1996), nous voulions comparer cette méthode enzymatique sensible au niveau d'hydratation du pollen avec une méthode non enzymatique telle que la coloration d'Alexander. Dans nos conditions d'expérimentation, la FCR a permis une meilleure estimation de la viabilité que la coloration d'Alexander, cette dernière ne permettant pas une identification aisée du statut des grains de pollen. Pline *et al.* (2002) ont montré que la FCR permettait une estimation fiable de la viabilité du pollen de coton alors que la coloration d'Alexander pouvait la surestimer. De plus, la FCR est également la méthode la plus fiable pour estimer la viabilité du pollen du genre *Silene* comparée à d'autres colorations (Mayer and Gottsberger, 2000).

En ce qui concerne l'évaluation de l'aptitude à germer, la méthode de germination *in vitro* de Matlob and Kelly (1973) nous a permis d'obtenir une bonne estimation de l'aptitude à germer du pollen de *C. melo*, bien que légèrement plus faible que pour *C. melo* var *flexuosus* et de *C. sativus* (Matlob and Kelly, 1973). Les valeurs de germinations enregistrées pour la méthode dérivée de Dumas de Vaulx (1992) et de Susin et Avarez (1997), en revanche, n' ont pas permis une estimation fiable de l'aptitude à germer du pollen et sont très éloignées des valeurs obtenues dans les mêmes conditions expérimentales par Cuny (1992) et Susin et Avarez (1997).

Cette étude a montré que le pollen extrait artificiellement, chimiquement ou mécaniquement, avait une qualité reproductrice plus faible que le pollen provenant des anthères. Il se peut que les grains de pollen extraits artificiellement soient davantage exposés aux stress environnementaux et présentent une qualité réduite. En effet, durant l'extraction chimique, le solvant utilisé a dissous le pollenkitt présent à la surface du sporoderme qui le protégait, alors qu'on peut penser que la majorité du pollen extrait mécaniquement provienne principalement de la périphérie de l'anthère et était donc plus exposé. Les deux modes d'extraction ont affecté de la même manière la viabilité du pollen. En revanche, le pollen extrait chimiquement était moins apte à germer que le pollen extrait mécaniquement. Il a été montré que l'utilisation de solvants organiques comme le pentane n'avaient pas d'effet sur la viabilité et sur l'aptitude à germer du pollen de nombreuses espèces (Iwanami and Nakamura, 1972 ; Jain and Shivanna, 1988a et b). Cependant, dans ces études, les temps d'incubation étaient plus longs que dans la présente étude. Il se pourrait que ces grains de pollen fragilisés par l'élimination de leur pollenkitt nécessitent un temps d'incubation plus important pour germer.

En conclusion, nos résultats ont montré que la FCR était la méthode la plus fiable pour estimer la viabilité du pollen de *C. melo*, et qu'elle pouvait être améliorée par l'ajout d'acide borique en cas de déshydratation du pollen. En ce qui concerne la germination *in vitro*, seule la méthode de Matlob et Kelly (1973) a permis d'obtenir une estimation fiable de l'aptitude à germer. Enfin, nous avons montré que l'extraction artificielle, qu'elle soit chimique ou mécanique affectait la qualité reproductrice du pollen, mais qu'elle permettait toutefois son utilisation pour nos expérimentations ultérieures et l'évaluation de sa viabilité et de son aptitude à germer.