

## Note de recherche forestière n° 58

### Établissement d'une gamme de viabilité du pollen de pin gris

Fablenne COLAS<sup>1</sup> et Stéphan MERCIER<sup>2</sup>

F.D.C. 163 (047.3)(714)  
L.C. SD 399.5 P 575

#### Résumé

La réalisation de croisements dirigés dans le cadre du Programme d'amélioration génétique des arbres nécessite l'utilisation de pollen ayant une viabilité élevée afin de maximiser le rendement en graines. En ce sens, l'évaluation de viabilité des lots de pollen devient un outil important dans le processus de pollinisation artificielle. Actuellement, cette évaluation est réalisée grâce aux tests de germination *in vitro*. Ces tests représentent un bon indicateur de la qualité du pollen. Toutefois, le délai au cours de la mise en culture est très long (3 jours) par rapport à la période de réceptivité des fleurs femelles (entre 3 et 4 jours). Ainsi, il devient pertinent de mettre au point des tests qui permettent d'estimer rapidement (moins d'une journée) le taux de viabilité d'un lot de pollen. Cependant, le développement de ces techniques nécessite préalablement la mise au point d'une gamme de viabilité qui permettra d'établir éventuellement la corrélation entre les résultats issus des tests de germination et ceux des tests rapides. Ainsi, des lots de pollen de pin gris ont été soumis à des traitements de chaleur afin de diminuer graduellement la viabilité du pollen. L'effet de la chaleur sur la viabilité du pollen est très marqué au cours de la première heure de traitement. À 73 °C, la réduction du taux de germination est trop rapide pour que l'on dispose de valeurs échelonnées à l'intérieur de la gamme de viabilité. À 60 °C, l'effet est irrégulier, rendant les résultats peu fiables. À 65 °C, la décroissance de la viabilité est régulière tout en étant plus importante au cours de la première heure.

Mots-clés : pollen, germination *in vitro*, température, gamme de viabilité, *Pinus banksiana*, pin gris.

#### Abstract

*Geneticists and breeders need pollen with high viability to improve seed yield. This viability can be assessed by in vitro germination. This technique is a good indicator of pollen quality but it is too long (3 days) as compared to the period of female flowers receptivity (3 or 4 days). In this context, it would be useful to develop tests which would allow measuring a pollen sample's viability in less than a day. However, to develop these techniques, we must first establish a viability scale allowing for eventual correlations between results of the rapid and germination tests. We looked for a treatment that would gradually alter the ability of pollen to germinate, and would thus yield different germination rates. Jack pine pollen samples were subjected to different heat treatments to decrease their viability. This reduction is very important during the first hour of treatment. At 73 °C, it is too rapid, and a gradual decrease cannot be observed. At 60 °C, the effect is irregular and therefore the results are not reliable. At 65 °C, the reduction of viability is regular, but it is still more important during the first hour of treatment. The germination rates are well dispersed along the viability scale.*

*Key words : pollen, in vitro germination, temperature, viability range, Pinus banksiana, Jack pine.*

\*\*\*

\*\*\*

1 D.E.S.S., attachée de recherche à la Faculté de foresterie et de géomatique de l'Université Laval.

2 Ing.f., M.Sc., chargé de recherches sur les semences et les pollens des arbres forestiers au Service de l'amélioration des arbres.

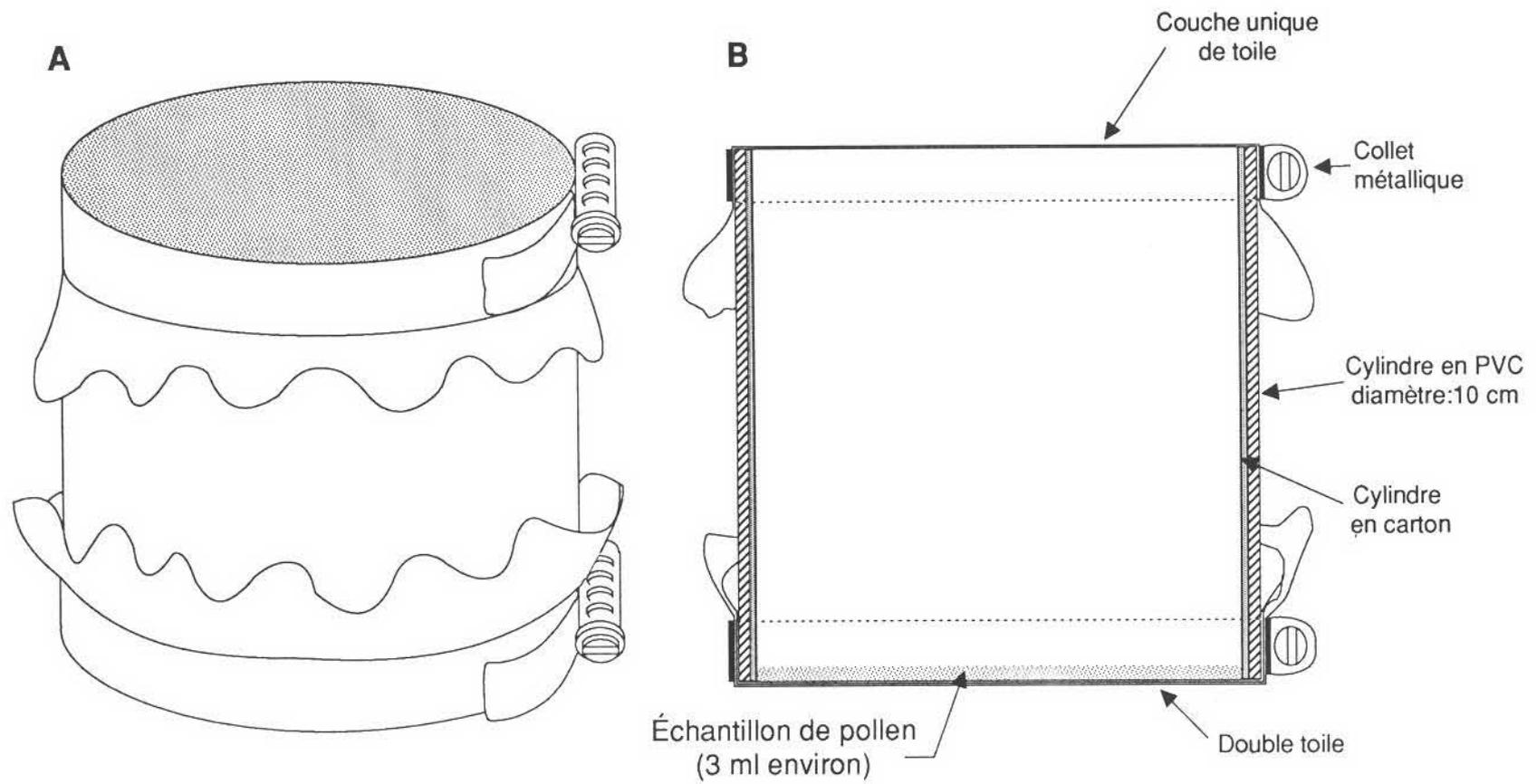


Figure 1. Contenants utilisés pour les traitements de chaleur du pollen de pin gris : a) vue en trois dimensions; b) coupe longitudinale du cylindre.

## Introduction

Les travaux de pollinisation compris dans le Programme d'amélioration génétique des arbres forestiers exigent du pollen ayant un taux de viabilité élevé afin de maximiser le rendement en graines. Dans cette optique, la viabilité du pollen peut être évaluée en déterminant le taux de germination *in vitro* sur un milieu de culture adapté et dans des conditions spécifiques à chaque espèce. Cette technique s'avère fiable bien que fastidieuse. De plus, les résultats pour le pollen de pin gris (*Pinus banksiana*) ne sont obtenus qu'après trois jours d'incubation alors que la période de l'anthèse ne dure que de 3 à 4 jours (COLAS 1992). Il devient ainsi pertinent de mettre au point des tests qui permettent d'estimer rapidement (moins d'une journée) le taux de viabilité d'un lot de pollen (BINDER et BALLANTYNE 1975, CHING *et al.* 1975, CHING et CHING 1976, HESLOP-HARRISON *et al.* 1984, WEBBER et BONNET-MASIMBERT 1988, WEBBER 1991).

Le développement des tests rapides nécessite au préalable la mise au point d'une gamme de taux de viabilité. Une courbe d'échantillonnage sera alors établie entre le résultat du test rapide et le taux de germination. Par la suite, la détermination rapide sera suffisante pour déterminer le taux de germination de l'échantillon. Malheureusement, peu d'études ont abordé cet aspect. KNOX *et al.* (1972) ont développé certaines techniques pouvant faire décroître progressivement la viabilité du pollen en utilisant la congélation et l'irradiation par rayons gamma. Par ailleurs, COLAS (1992) a testé l'effet sur la viabilité d'une exposition du pollen de pin gris à différentes températures (40 °C et 50 °C). À l'issue de ces traitements, aucune réduction significative du taux de germination *in vitro* du pollen n'avait été observée. D'autres travaux ont démontré qu'une température trop élevée tuait le pollen après une heure d'exposition (PHILIPPE 1993).

À l'issue de l'étude de COLAS (1992), il apparaît que l'application de températures situées entre 50 et 75 °C fournirait des résultats permettant d'établir une gamme de viabilité. L'exposition du pollen à la chaleur présente les avantages d'être très facile à exécuter et d'exiger peu d'équipement. La présente étude porte donc sur la mise au point d'un traitement d'exposition à la chaleur afin d'obtenir une décroissance régulière du taux de germination *in vitro* du pollen de pin gris. Le pin gris a été retenu en raison de l'abondance des fleurs mâles produites chaque année et de la grande facilité de manipulation et de mise en culture de son pollen.

## Matériel et méthodes

### Matériel

Le pollen de pin gris a été récolté le 17 mai 1993 dans un parc à clones situé à l'arboretum de Lotbinière (46° 30' N; 71° 55' O). Les fleurs mâles ont été récoltées sur une vingtaine de clones différents, greffés en 1976. Dès la récolte, toutes les fleurs mâles ont été mélangées. Après un séchage des fleurs de 16 heures à 25 °C dans un four à convection, le pollen a été extrait, séché à 40 °C durant 4 heures, puis réparti dans des flacons en verre de 10 ml (de type contenant à pénicilline) et conservé à 4 °C dans un dessiccateur contenant de la *Drierite*. Chaque flacon conte-

naît environ 7 ml de pollen. Durant la première semaine de conservation, les bouchons en caoutchouc des bouteilles ont été percés avec une aiguille de seringue de façon à permettre l'élimination des gaz pouvant se dégager pendant la conservation.

### Méthodes

#### Traitement du pollen par la température

Une quantité de pollen équivalant à 3 ml environ a été déposée en couche mince et uniforme dans un cylindre en chlorure de polyvinyle (diamètre intérieur de 10 cm) dont les ouvertures sont fermées avec une toile en nylon *Monotoron* à fils soudés de mailles de 35 µm (*Société Tripette et Renaud*). Ces toiles sont maintenues à l'aide d'un collet métallique ajustable. La toile supérieure a pour objet d'éviter toute contamination entre les échantillons alors que celle du fond a été doublée afin d'éviter les fuites de pollen (figure 1).

Quatre répétitions furent réalisées pour chaque température testée. Les cylindres ont été disposés sur la grille centrale d'un four à convection préchauffé à la température choisie (*Precision Scientific Economy Model 18EM*). Grâce à la circulation de l'air, un équilibre de température entre l'échantillon et l'extérieur a été rapidement atteint.

Chaque répétition a nécessité l'emploi de 3 ml de pollen. Pour chaque expérience, deux flacons ont été utilisés. De façon à disposer d'un même échantillon pour les quatre répétitions, le contenu de deux flacons a été mélangé puis divisé en quatre sous-échantillons équivalents.

Lors de chaque prélèvement, tous les cylindres ont été sortis du four au même moment. Après homogénéisation, un sous-échantillon représentatif de chaque répétition a été prélevé à l'aide d'une spatule métallique. Le pollen a été déposé dans un microtube *Eppendorf* de 1,5 ml. Les cylindres ont été replacés tout en modifiant leur emplacement dans le four de façon à éviter un éventuel effet de position. La température dans le four a été évaluée tout au long de l'expérience de façon à quantifier les éventuels écarts pouvant apparaître au cours du temps.

Les températures testées étaient de 60, 65 et 73 °C. Les intervalles de temps entre chaque prélèvement ont varié au cours de l'expérience. Durant la première heure, les prélèvements ont eu lieu toutes les dix minutes puis, durant les trois heures suivantes, toutes les trente minutes et enfin toutes les heures pour les trois heures restantes. Au total, quinze prélèvements ont été réalisés, y compris au temps zéro.

Une étude réalisée sur le pollen de *Brassica* a montré une baisse significative de la viabilité du pollen lors d'un traitement par la température. L'effet est significatif dès 60 °C (RAO *et al.* 1992). Des résultats préliminaires (données non publiées) montrent une décroissance très rapide du taux de germination au cours de la première heure du traitement. En conséquence, la fréquence des prélèvements a été augmentée durant la première heure de traitement, puis ils ont été espacés car l'effet de la température devenait plus lent à apparaître.

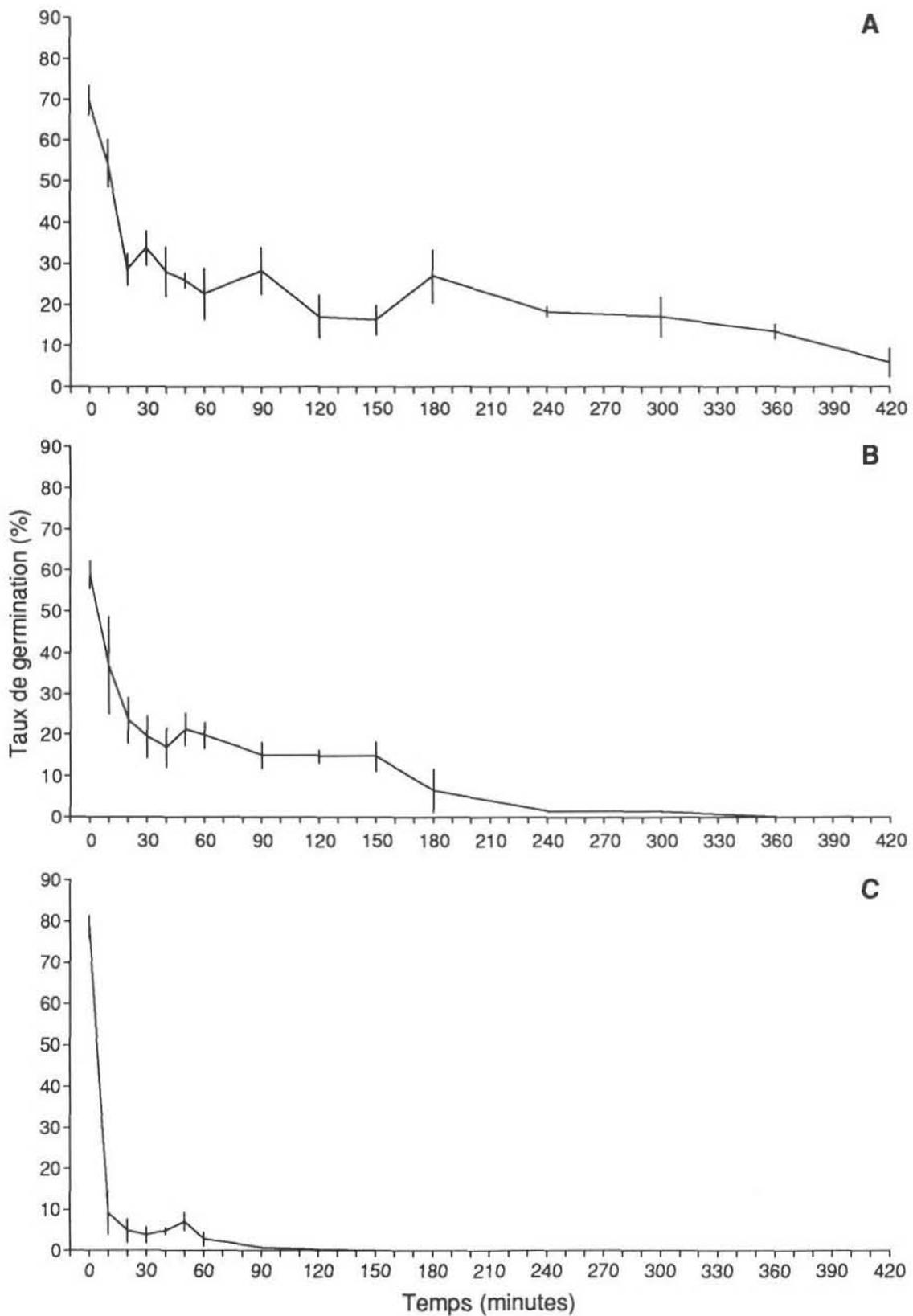


Figure 2. Suivi du taux de germination (exprimé en pourcentage) du pollen de pin gris avec un traitement de température à : a) 60 °C, b) 65 °C et c) 73 °C. Les barres verticales correspondent aux écarts-types.

## Évaluation de la viabilité du pollen

Le pollen a été rapidement mis en culture sur le milieu de BREWBAKER et KWACK (1963) additionné de 5 % de saccharose et de 1 % d'agar et dont le pH est ajusté à 5,3. Ce milieu est coulé dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre. Un disque de papier filtre stérile, humidifié avec de l'eau stérile, a été déposé dans le couvercle de la boîte de Pétri de façon à réaliser une réhydratation du pollen et à éviter la dessiccation. La boîte est scellée à l'aide d'une bande de *Parafilm*. La durée d'incubation nécessaire pour un taux de germination maximum est de 3 jours à 25 °C et à l'obscurité. Pour limiter les contaminations fongiques et bactériennes, la mise en culture a dû être réalisée dans des conditions stériles (milieu de culture stérilisé en autoclave et coulé dans des boîtes de Pétri stériles, travail sous une hotte à flux laminaire à proximité d'une flamme). Ces conditions de culture ont été établies lors d'une étude précédente (COLAS 1992).

L'observation du pollen a été réalisée en déposant directement la boîte de culture sur la platine du microscope optique. Le grossissement utilisé a été de 100 X. Le taux de germination a été déterminé à l'issue des trois jours de culture. On considère comme germés les grains de pollen ayant émis un tube pollinique dont la longueur est deux fois supérieure à leur diamètre. Le taux de germination a été estimé selon le rapport suivant :

$$\text{Viabilité (\%)} = \frac{\text{Nombre de grains germés}}{\text{Nombre total de grains}} \times 100 \quad [1]$$

La table fournie par STANLEY et LINSKENS (1974) donne la taille de l'échantillon à dénombrer pour obtenir des résultats statistiquement valables au seuil de 5 % (voir annexe).

## Résultats

Pour chaque traitement appliqué, les mesures de la viabilité du pollen montrent une décroissance plus ou moins rapide au cours du temps. Dans chaque cas, la première heure de traitement entraîne une très forte perte de viabilité.

### Traitement à 60 °C

Au cours de la première heure de traitement, le taux de germination passe, en moyenne, de 69,8 à 22,6 %. Par la suite, la courbe devient irrégulière et aboutit, au bout de sept heures (420 minutes), à une valeur de 5,8 % (figure 2a).

Au bout de 30 minutes, le taux de germination mesuré est supérieur à celui observé au prélèvement précédent (20 minutes). Une telle augmentation est aussi observée à 90 et 180 minutes.

### Traitement à 65 °C

La chute du taux de germination est très forte durant les soixante premières minutes. Le taux de germination passe en moyenne de 58,9 à 19,8 %. Entre 90 et 150 minutes, un plateau est atteint à 15 %. Puis la décroissance est régulière, pour aboutir à zéro après six heures (360 minutes) d'exposition (figure 2b). On observe une augmentation du taux de germination à 50 minutes.

### Traitement à 73 °C

Les dix premières minutes d'exposition entraînent une très forte réduction du taux de germination, qui passe, en moyenne, de 78,6 à 9,2 %. Au bout de 150 minutes, le taux de germination est nul (figure 2c).

## Discussion

Les trois traitements appliqués entraînent une réduction significative du taux de germination du pollen. Celle-ci est plus ou moins rapide selon la température. L'application d'un traitement à 73 °C entraîne la mort du pollen en 150 minutes. La perte de viabilité observée est très rapide, c'est-à-dire moins de soixante minutes. À une telle température, il faudrait réduire l'intervalle de temps entre les prélèvements pour observer une diminution moins brutale du taux de germination. Ceci est impossible car les contraintes associées à la manutention des contenants lors des prélèvements limitent l'intervalle de temps entre chaque prélèvement à un minimum de dix minutes afin de maintenir la température la plus constante possible dans le four.

Le traitement à 60 °C permet au pollen de perdre progressivement sa viabilité au cours des sept heures du suivi. Les valeurs observées sont très irrégulières. De plus, le taux de germination final est supérieur à zéro (5,8 %). L'application d'une température de 60 °C provoque des modifications du métabolisme du grain de pollen. Toutefois, l'observation de valeurs ne suivant pas une décroissance régulière indique que le pollen ne réagit pas de façon homogène. Il se pourrait que la température de 60 °C soit proche de la valeur critique à partir de laquelle un effet léthal de la température peut être mis en évidence.

L'exposition du pollen à 65 °C entraîne une réduction du taux de germination du pollen qui est assez régulière tout au long des sept heures de traitement. La valeur initiale du taux de germination est inférieure aux valeurs observées lors des deux autres traitements. Cette différence peut être due au vieillissement du pollen. En effet, les traitements à 60 et 73 °C ont été réalisés avant le traitement à 65 °C; au cours de cet intervalle de temps, une perte de viabilité, liée aux conditions de conservation, est possible. La valeur du taux de germination initial est peu importante mais elle doit tout de même être supérieure à 60 %. En effet, le but de cette étude est de définir les conditions dans lesquelles une baisse progressive de la viabilité peut être observée.

La circulation de l'air dans le four à convection utilisé permet d'établir rapidement un équilibre de température entre le matériel traité et le milieu extérieur. De plus, l'utilisation d'une fine toile pour couvrir les cylindres contenant le pollen facilite la circulation de l'air. L'emploi d'un tel dispositif expérimental permet d'appliquer des traitements de courte durée et ainsi mettre en évidence un effet rapide de la température sur le taux de germination du pollen. Toutefois, l'intervalle de temps minimum entre deux prélèvements doit être fixé à dix minutes. En effet, le temps nécessaire à la manutention des contenants lors des prélèvements entraîne une certaine baisse de température à l'intérieur du four et la multiplication des prélèvements très rapprochés nuirait au maintien d'une température stable. La mesure de la température au cours de l'expérience a révélé des variations. Quelle que soit la température testée, les variations sont de la même amplitude, c'est-à-dire de plus ou moins 2 °C.

Au cours du traitement, le taux de germination du pollen a pu présenter une certaine augmentation. Ce phénomène est sans doute attribuable à la technique retenue pour le test et l'évaluation de la germination du pollen. En effet, le pollen est déposé à l'aide d'une spatule sur le milieu de culture. Réalisé manuellement, cet ensemencement n'est pas toujours régulier, ce qui peut entraîner la présence de zones où la densité de pollen est localement élevée. Plus la densité des grains de pollen est élevée, plus la germination des grains est favorisée et les tubes émis sont de plus grande taille. BREWBAKER et KWACK (1963) ont attribué cet « effet de groupe » à la libération de calcium par les grains de pollen, dans le milieu de culture, qui favoriserait le développement des tubes polliniques. La réalisation de multiples mesures sur un même échantillon permet de révéler les variations du taux de germination non représentatives du traitement appliqué. Il est donc important de se placer dans des conditions d'expérience les plus constantes possibles, notamment en réalisant un ensemencement le plus régulier possible, pour chacun des prélèvements.

Même si l'on connaît les effets du traitement, les valeurs des taux de germination seront spécifiques à chaque échantillon. Tous les échantillons utilisés pour la réalisation de ce travail proviennent d'un mélange de pollen de pin gris récolté sur différents arbres de clones différents mais de la même provenance géographique. De nombreux auteurs qui ont travaillé sur la mise au point des tests de germination *in vitro* de pollen de différentes espèces ont constaté des résultats différents en raison du génotype ou du cultivar des pollens testés (FERNANDEZ-ESCOBAR *et al.* 1983, LA PORTA et ROSELLI 1991, WON LEE *et al.* 1985). L'étape suivante de ce travail sera d'appliquer le traitement à 65 °C à des pollens provenant d'arbres bien identifiés; ainsi, un effet du génotype pourra éventuellement être identifié.

## Conclusion

Cette étude est l'étape préliminaire à la mise au point de tests rapides permettant une évaluation quasi instantanée de la viabilité du pollen. Le pollen de pin gris traité durant sept heures à 65 °C présente une réduction progressive de la viabilité qui correspond bien aux buts visés.

Par ailleurs, le pollen utilisé pour cette étude est un mélange de différents clones; il est fréquent de mettre en évidence des différences de comportement du pollen en raison de la variété ou du génotype. La mise au point de corrélations entre les taux de germination et des valeurs d'indices biologiques pourra ensuite être réalisée après qu'on aura vérifié l'effet du génotype.

## Remerciements

Cette étude n'aurait pu être réalisée sans la précieuse aide de monsieur Carol Parent lors de la récolte des échantillons. Cette étude est inscrite dans le projet de recherche n° 3410-032120 (02-01) du Service de l'amélioration des arbres.

## Références

- BINDER, W.D. et D.J. BALLANTYNE, 1975. *The respiration and fertility of Pseudotsuga menziesii (Douglas fir) pollen*. Can. J. Bot. 53(9) : 819-823.
- BREWBAKER, J.L. et B.H. KWACK, 1963. *The essential role of calcium ion in pollen germination and tube growth*. Amer. J. Bot 50(9) : 859-865.
- CHING, T.E. et K.K. CHING, 1976. *Rapid viability tests and aging study of some coniferous pollen*. Can. J. For. Res. 6 : 516-522.
- CHING, T.E., N.W. RANZONI et K.K. CHING, 1975. *ATP content and pollen germinability of some conifers*. Plant Sci. Letters 4 : 331-333.
- COLAS, F., 1992. *Influence de la teneur en eau dans la détermination et le maintien de la viabilité du pollen d'arbres forestiers*. Ministère des Forêts du Québec, Direction de la recherche. Rapport interne n° 345. 69 p.
- FERNANDEZ-ESCOBAR, R., G. GOMEZ-VALLEDOR et L. RALLO, 1983. *Influence of pistil extract and temperature on in vitro pollen germination and pollen tube growth of olive cultivars*. J. Hort. Sci. 58(2) : 219-227.
- HESLOP-HARRISON, J., Y. HESLOP-HARRISON et K.R. SHIVANNA, 1984. *The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure*. Theor. Appl. Genet. 67 : 367-375.
- KNOX, R.B., R.R. WILLING et L.D. PRYOR, 1972. *Interspecific hybridization in Poplar using recognition pollen*. Silvae Genet. 21 (3-4) : 65-69.

LA PORTA N. et G. ROSELLI, 1991. *Relationship between pollen germination in vitro and fluorochromatic reaction in cherry clone F12/1 (Prunus avium L.) and some of its mutants.* J. Hort. Sci. 66(2) : 171-175.

PHILIPPE, G., 1993. Communication personnelle.

RAO, G.U., AJAY JAIN et K.R. SHIVANNA, 1992. *Effects of high temperature on Brassica pollen : viability, germination and ability to set fruits and seeds.* Ann. Bot. 68 : 193-198.

STANLEY, R.G. et H.F. LINSKENS, 1974. *Pollen : biology, biochemistry, management.* Springer-Verlag, New-York. 307 p.

WEBBER, J.E., 1991. *In vitro testing of conifer pollen, germination, conductivity, respiration and field testing.* Proc. Pollen Management Workshop, February. 22 p.

WEBBER, J.E. et M. BONNET-MASIMBERT, 1988. *The influence of the moisture content of the pollen of forest trees on its response to different viability tests.* Symp. internat. physiol. arbres for., IUFRO, Nancy, 25-30 septembre. 6 p.

WON LEE, C., J.C. THOMAS et S.L. BUCHMANN, 1985. *Factors affecting in vitro germination and storage of jojoba pollen.* J. Amer. Hort. Sci. 110(5) : 671-676.

#### Annexe

Taille de l'échantillon à dénombrer pour avoir des données statistiquement valables au seuil de 5 %  
(tiré de STANLEY et LINSKENS 1974)

Pourcentage de germination (%)	Nombre de grains à compter
1 ou 99	15
5 ou 95	73
10 ou 90	138
15 ou 85	196
20 ou 80	246
25 ou 75	288
30 ou 70	323
35 ou 65	350
40 ou 60	369
45 ou 55	380
50	384



Gouvernement du Québec  
**Ministère des Ressources  
naturelles**

**FQ94-3020**

ISSN 0834-4833  
ISBN 2-550-28838-6  
Dépôt légal 1994

Bibliothèque nationale du Québec  
Bibliothèque nationale du Canada  
© Gouvernement du Québec 1994