

LA LONGEVITE DU POLLEN DE COLZA

JACQUELINE PIERRE¹, Michel RENARD²

¹ UMR INRA/ENSAR, BiO3P, BP 35327, 35653 Le Rheu cedex
< pierre@rennes.inra.fr >

² UMR Amélioration des plantes et biotechnologies végétales, BP 35327, 35653 Le Rheu cedex < michel.renard@rennes.inra.fr >

Résumé

La longévité du pollen de colza a été étudiée lorsque celui-ci est soumis à 4 conditions de température et d'hygrométrie (conditions extérieures ; 20°C et HR 60% ; 20°C et HR 40% ; 3 à 5°C. et HR variable de 40 à 95%) pendant une durée de 0 à 15 jours. Cette longévité a été mesurée selon deux critères très différents : la viabilité et le pouvoir fécondant sur fleur mâle-stériles coupées maintenues en culture. La viabilité a été testée par une réaction de coloration au T.T.C. (Triphényl Tétrazolium Chloride). Les résultats montrent que la viabilité du pollen décroît très rapidement au bout de huit jours. C'est en conditions extérieures que la longévité est la plus courte (taux de viabilité de 9% à 8 jours). Les conditions les plus conservatrices sont celles correspondant à une faible température même lorsque l'hygrométrie peut être très élevée. Dans tous les cas, la longévité ne dépasse pas 15 jours.

Malgré les difficultés rencontrées pour la mise en œuvre du test du pouvoir fécondant sur fleurs mâle-stériles coupées, les résultats obtenus sont conformes au test de viabilité par coloration. Ces valeurs sont supérieures à celles observées antérieurement en utilisant une autre technique (3 jours).

Ces résultats amènent deux conclusions. La première est d'ordre technique : le test T.T.C. de viabilité, simple et rapide, donne une bonne estimation du pouvoir fécondant effectif du colza et pourra être utilisée pour tester diverses variétés de colza. La seconde concerne les risques de dispersion de pollen par le vent sur de longues distances : le pollen une fois mis en suspension dans les couches de l'atmosphère où la température est faible et l'hygrométrie très variable conserve son pouvoir fécondant suffisamment longtemps pour subir sans dommage un transport atmosphérique durant plusieurs jours.

Abstract :

Pollen longevity of oilseed rape was studied under 4 conditions of temperature and relative humidity (external conditions ; T° 20°C., RH 40% ; T° 20°C., RH 60% ; T° 3 to 5°C., RH 40 to 95%) and during 0 to 15 days. Longevity was measured by viability (Triphenyl Tetrazolium Chlorid stainability test) and by pollination effectiveness which was tested on cut female flowers (fruit set and number of seeds per pod). The results showed that the viability decreased until 8 days. Low temperature with variable RH was the most conservative treatment (9% on the 8th day). In all situations, viability did not exceed 15 days. The testing of pollination effectiveness was more difficult to manage, nevertheless the results were in accordance with the viability tests. Our results indicate a higher longevity than that previously described in the literature (3 days).

These results lead to two conclusions. First, the TTC stainability test is a rapid and reliable method to study pollen longevity and could be used to study the variability of pollen longevity in various oilseed rape varieties. Secondly, when considering the longevity of pollen under variable conditions and especially under low temperature, it can be assumed that a long distance and efficient pollen dispersal over several days in the atmosphere is possible.

Key words : oilseed rape, pollen, longevity, dispersal

Connaître la longévité d'un pollen est une donnée particulièrement intéressante dans le cadre des études de risques de dissémination du pollen. En effet, cela permet de savoir combien de temps une parcelle dont la floraison est terminée reste une source de pollen fécondant. Par ailleurs, une étude de la longévité du pollen pourrait permettre de mieux comprendre les résultats en apparence contradictoires obtenus au cours de diverses expérimentations menées sur la dissémination du pollen de colza. Ainsi, alors que des travaux montrent que ce pollen est peu anémophile (2) et qu'au niveau de la parcelle sa dispersion se fait sur de courtes distances (4, 7, 8), des cas de contaminations sur de grandes distances ont été signalés (11) et les relevés palynologiques effectués sur des filtres (placés à 10m de hauteur voire plus) confirment que ce pollen peut se disperser sur de grandes distances (6). Toutefois, on ignore si le pollen ainsi collecté est viable ou non. Si l'on fait l'hypothèse que cette dernière dispersion se fait par le biais de la mise en suspension du pollen dans l'air dans les couches de l'atmosphère et que son transport dure un certain temps, il devient également nécessaire de connaître la durée de vie du pollen pour mieux évaluer les risques de ce type de dissémination.

Au plan méthodologique mesurer la longévité du pollen peut *a priori* paraître simple. Cependant les critères retenus peuvent être nombreux et divers : mesure de la viabilité, mesure du pouvoir germinatif *in vitro* ou *in vivo*, mesure du pouvoir fécondant réel. Dans chacun des cas les techniques appliquées sont différentes et chacune comporte des biais parfois importants tels que des faux positifs dans les tests colorimétriques de viabilité, l'incidence du milieu de culture dans les tests de germination *in vitro* sans parler des tests présentant des risques carcinogènes pour l'expérimentateur (1). De plus, certains tests ne donnent que des résultats d'ordre qualitatif et l'erreur majeure réside le plus souvent dans une sous estimation de la longévité.

L'objectif de notre travail a donc été double : d'une part, mesurer la longévité du pollen de colza dans diverses conditions de température et d'hygrométrie correspondant à des situations type et d'autre part, tester cette longévité selon deux méthodes très contrastées afin de valider au mieux les résultats et choisir à l'avenir la méthode la plus rapide et la plus fiable.

Du pollen de colza (cv. 'Tanto') a été prélevé au tout début de l'anthèse sur des plantes cultivées au champ. Le pollen a été maintenu durant 15 jours dans les 4 conditions de température et d'humidité relative suivantes :

Traitement 1 : conditions extérieures du 9 au 31 juillet 2001

T° de 11 à 18°C., HR de 66 à 92%

Traitement 2 : T° 20°C., HR 40% (16h jour ; 8h nuit)

Traitement 3 : T° 20°C., HR 60% (16h jour ; 8h nuit)

Traitement 4 : T° 3 à 5° C., HR de 40 à 95% (16h jour ; 8h nuit)

Les tests ont été effectués sur le pollen aux jours J, soit à Jo (pollen frais), J3, J8, J10, J15.

Mesure de la viabilité par test colorimétrique TTC

Parmi six tests de viabilité référencés (1), le test de coloration par T.T.C. (Triphényl Tétrazolium Chloride) a été retenu comme paraissant, selon la littérature, le plus fiable et le plus rapide. Il est basé sur une réaction d'oxydoréduction. Les grains vivants possèdent des enzymes d'oxydo-réduction qui participent à la respiration et dont la présence peut être détectée par une réaction de coloration. Dans le cas du test T.T.C., les grains deviennent rouges alors que les grains morts dont les enzymes ne sont plus fonctionnels restent jaunes.

Après une préparation qui prend environ 3 heures et suivie d'une lecture au microscope, le taux de viabilité est directement évalué, par le ratio grains colorés en rouge/grains totaux, exprimé en pourcentage. Les comptages ont été faits sur 30 grains et répétés 12 fois par traitement (4 répétitions de chacune des séries). Une analyse de variance a été faite afin de comparer les traitements entre eux respectivement aux jours J0 (pollen frais), J3, J5, J8, J15.

Le suivi de l'évolution du taux de viabilité du pollen (Figure 1) montre en premier lieu que le pollen frais recueilli pour les tests était de bonne qualité (taux moyen de viabilité de 93,7%). Une différence entre les traitements apparaît dès le troisième jour : en particulier le taux de viabilité du traitement en conditions naturelles (T1=59,9%) est très inférieur celui du traitement en conditions les plus froides (T4=89,9%), les traitements T2 et T3 présentent des résultats intermédiaires entre les deux situations (respectivement 77,9% et 85,3 %). A huit jours, les traitements T1, T2 et T3 sont encore significativement différents entre eux mais assez peu comparés à T4. Au bout de 10 jours, seul le traitement T4 permet une assez bonne conservation de la viabilité (34.5%) alors que pour tous les autres traitements celui-ci n'est que 3,5% en moyenne. Au final, le traitement dans les conditions les plus froides et avec une hygrométrie très variable est le plus conservateur et le maintien à une température constante de 20° C. (T2, T3) permet une meilleure conservation qu'à des températures et hygrométries très variables (T1). Quelque soit le traitement la longévité du pollen de colza n'excède pas 15 jours.

Mesure du pouvoir fécondant sur fleurs mâle-stériles coupées

Afin de tester le pouvoir fécondant du pollen *in vivo*, le pollen a été déposé sur des fleurs mâle-stériles (lignée 'Fu-Tanto') cultivées au champ, coupées puis maintenues en culture durant 40 jours selon une technique développée par ailleurs (5, 12) en veillant au choix des fleurs femelles (stade et position dans la plante). Les dépôts ont été faits de manière à

optimiser la pollinisation (stigmate largement recouvert de grains de pollen). Le pouvoir fécondant a été mesuré par le taux de nouaison (nombre de fleurs ayant donné des siliques/nombre de fleurs, en pourcentage) et par le nombre de graines par siliques. Soixante fleurs ont été testées par traitement.

Les données relatives au taux de nouaison se sont révélées plus délicates à interpréter que les taux de viabilité. En effet, une fleur non fécondée ne développe pas de siliques à proprement parler et cette silique de taille très réduite est très sensible aux attaques par les champignons et bactéries malgré les conditions stériles dans lesquelles sont réalisées les manipulations. Lorsque la silique est contaminée, il est impossible de savoir s'il y eu ou non formation effective d'une silique avec production de graines. Les taux de nouaison sont donc aussi le reflet du taux de survie. Par ailleurs, les comptages de graines par siliques bien formées montrent que ceux-ci ne dépassent jamais 9 ce qui est l'indice d'une mauvaise fécondation (espérance habituelle : 20 graines par silique). Cet échec de pollinisation n'atteste pas pour autant une absence de viabilité du pollen mais peut aussi provenir du fait que la plante femelle est placée dans des conditions de survie.

Malgré ces restrictions, il est possible de dégager de l'ensemble des données (Figures 2 et 3) les conclusions suivantes : le taux de nouaison-survie des plantes pollinisées avec du pollen frais est assez élevé (J0=85%) mais le nombre de graines par silique est faible (4 en moyenne, maximum 9). Le taux de nouaison reste non négligeable pour un pollen âgé de huit jours dans le cas des traitements T1, T2, T3 (J8 de 60 à 77%) et il faut noter que c'est une fois encore le traitement T4 qui est le plus conservateur (85%). Entre J0 et J8, on assiste à une baisse du taux de nouaison pour tous les traitements qui est imputable à une contamination par des champignons et des bactéries durant cette période. Au delà de J8, le taux décroît très rapidement et devient nul pour un pollen âgé de 15 jours. Le nombre de graines par silique formée décroît de la même manière mais aucune différence n'apparaît entre les traitements sans doute parce que le nombre de graines produites est trop faible.

CONCLUSION

Il s'avère que les deux méthodes appliquées pour étudier la longévité du pollen bien que très différentes donnent des résultats concordants. Il semble acquis que, pour la variété « Tanto », la durée de vie du pollen n'excède pas 10 à 15 jours. Techniquement, l'étude du pouvoir fécondant *in vivo* sur fleur coupée est longue à mettre en œuvre et comporte de nombreux aléas liés à la technique elle-même. Elle présente l'inconvénient d'introduire une interaction entre le pollen et l'état physiologique de la plante réceptrice, phénomène certes incontournable lorsque l'on effectue des tests *in vivo* mais qui dans ce cas est accentué par le fait que la fleur femelle est maintenue sur milieu artificiel (risque de contaminations). Il faut souligner qu'une expérimentation préliminaire portant sur la viabilité du pollen de 0 à 30 jours dans les mêmes conditions de traitement avait déjà montré que le pollen avait une durée de vie maximale de 15 jours. Ainsi, à l'avenir, on pourra retenir le test de viabilité par coloration T.T.C. comme étant une technique rapide et fiable pour mesurer la variabilité de la longévité de diverses variétés de colza.

Les résultats montrent que contrairement à ce qui est généralement rapporté sur les conditions de stockage du pollen (3, 10), une hygrométrie élevée n'entraîne pas chez le colza une réduction de la durée de vie sous réserve que les températures soient assez basses (3 à 5°C). De même les fortes pluies et fortes variations de température (ou d'ensoleillement enregistrées en conditions extérieures (bilan sur 2 années) permettent une durée de vie d'une semaine à 10 jours. Ces valeurs sont supérieures à celles trouvées au cours de tests de germination effectués *in vitro* (technique de la goutte pendante) lors d'études précédentes et qui étaient de 3 jours (9).

Au vu de nos derniers résultats, on peut admettre qu'une parcelle source restera contaminante un peu plus d'une semaine voire 15 jours après la fin de floraison, même si ce risque reste limité compte tenu de la diminution progressive de la quantité de pollen émise

en fin de floraison. Par ailleurs, en ce qui concerne les contamination à distance au cours de la pleine floraison, on peut admettre que le pollen quand il est mis en suspension dans les couches moyennes de l'atmosphère (abaissement de la température de 0,7°C par élévation de 100m) conserve une viabilité qui permettra des contaminations même après plusieurs jours de transport par le vent dans des conditions d'hygrométrie très variables.

Remerciements

Ce travail a été réalisé avec l'appui technique d'Arnaud Le Pors. Il a été effectué dans le cadre de l'Action Incitative Programmée de l'INRA « OGM et Environnement ».

Références

1. DAFNI D. (1992). *Pollination ecology, a practical approach*. The practical series editors , Rickwood D., Hames B.D., eds.
2. EISIKOWITCH D. (1981). Some aspects of pollination of oilseed rape. *J agric Sci, Cambridge*, 96 : 321-6.
3. HANNA W. W. , TOWILL L. E. (1995). Long term pollen storage. In : *Plant breeding reviews*, Jules Janick, ed., vol. 13, 179-207.
4. LAVIGNE C., KLEIN E.K., VALLÉE P., PIERRE J., GODELLE B., RENARD M. (1998). A pollen dispersal experiment with transgenic oilseed rape. Estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field. *Theor Appl Gen* 96 : 886-96.

5. LARDON A. (1991). Mise au point d'une technique de culture de fleurs isolées chez le colza
Rapport de stage, Univ. Claude Bernard, Lyon.
6. MCCARTNEY H.A., LACEY M.E. (1991). Wind dispersal of pollen from crops of oilseed rape
(*Brassica napus*). J Aerosol Sci 22 : 467-77.
7. MESQUIDA J., RENARD M. (1982). Etude de la dispersion du pollen par le vent et de
l'importance de la pollinisation anémophile chez le colza. Apidologie 13 : 353-66.
8. MESQUIDA J., RENARD M. (1984). Etude des quantités de pollen déposées sur les
stigmates dans différentes conditions de pollinisation, influence sur la production de graines
chez les colzas d'hiver mâle-fertiles. In : Cinquième symposium sur la pollinisation, INRA
Ed., Les colloques de l'INRA, 21 : 351-6.
9. MESQUIDA J., RENARD M., MESQUIDA B. (1987). Etude préliminaire sur la germination *in*
vitro du pollen de colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg.) et sur l'évolution dans le
temps de son aptitude à germer. Agronomie 7 : 409-16.
10. STANLEY R.G., LINSKENS H. F. (1974). Pollen : biology, biochemistry, management.
Springer-Verlag, ed.
11. TIMMONS A.M., O'BRIEN E.T., CHARTERS Y.M., DUBBELS S.J., WILKINSON M.J. (1995).
Assessing risk of wind pollination from field of genetically modified *Brassica napus* ssp
oleifera. Euphytica 85 : 417-23.
12. TRIBOI-BLONDEL A.M., CASTANO-COLABELLI M., MERRIEN A. (1991). Germinability and
viability of rapeseed pollen under the effect of temperature. Proc. 8th International rapeseed
congress, Saskatoon, Canada, 9-11 July 1991.