

## Pollen et ressources génétiques

par André CHARRIER

Bureau des ressources génétiques - MRT, Paris ORSTOM, F-34032 Montpellier

**Résumé.**- La conservation de pollens viables présente des avantages certains du point de vue des ressources génétiques. Il existe cependant peu de banques de pollens à ce jour, principalement de plantes ligneuses fruitières et forestières. Notre connaissance de la biologie et des méthodes de conservation des pollens d'espèces végétales variées a progressé au cours des années 80. On peut désormais pratiquer largement la conservation du pollen avec un contrôle précis de sa déshydratation et l'utilisation de températures cryogéniques.

**Summary.**- Pollen storage is an interesting procedure for conservation of plant genetic resources, in spite of the limited number of pollen gene banks existing mainly for fruit and forest species. Recent progress on pollen physiology and methodologies of pollen storage allow us to develop this procedure. We can now obtain an efficient preservation of viable pollen by means of a controlled dehydration and the use of cryogenic temperatures.

**Key words :** genetic resources - pollen - preservation - physiology.

\*

\* \*

Différentes méthodes de conservation des ressources phylogénétiques ont été développées : réserves naturelles et jardins botaniques, banques de semences, collections de plantes en champ, vitrothèques... Chacune d'elles présente des avantages comparatifs en rapport d'une part, avec le comportement biologique des espèces (cycle de vie, mode de reproduction, graines orthodoxes ou récalcitrantes), d'autre part, avec les stratégies (conservation statique ou dynamique), la durée (court, moyen et long terme), la fiabilité (technologies en jeu, conformité génétique) et le coût de la conservation.

Quant à l'emploi du pollen, il n'est souvent évoqué que de façon marginale dans les ouvrages traitant de la conservation des ressources génétiques (Kartha, 1985 ; Pernes, 1984 ; Frankel et Hawkes, 1975). Pourtant, la conservation du pollen présente certains avantages qui ont favorisé son emploi en amélioration des plantes, surtout chez les arbres forestiers et fruitiers (Franklin, 1981 ; Visser et Oost, 1981). Rappelons les brièvement : le stockage sous un faible volume, en laboratoire, de milliers de génotypes ; les facilités de transport et de diffusion du pollen ; la réalisation d'hybridations entre plantes

dispersées dans l'espace et à floraison décalée dans le temps (la phase juvénile des géniteurs mâles peut ainsi être évitée).

Diverses raisons sont invoquées pour expliquer le nombre limité de banques de pollen ;

- le matériel végétal conservé est un échantillon des gamétophytes mâles du pied-mère dépendant de sa structure génétique et de son mode de reproduction ;

- les méthodes de conservation utilisées assurent un maintien de la viabilité du pollen limitée dans le temps (un à deux ans, exceptionnellement dix ans) ;

- les résultats de la conservation sont trop erratiques (génotypes parentaux, sélection gamétique) ;

- le rassemblement d'échantillons de pollen représentatifs d'un complexe d'espèces donné n'est pas chose aisée : certains groupes végétaux fleurissent peu et/ou produisent peu de pollen ; d'autres sont très sensibles aux conditions environnementales pour fleurir ; enfin l'aptitude du pollen à la conservation est variable avec les espèces.

Les progrès réalisés au cours de la dernière décennie sur la biologie et les méthodes de conservation du pollen peuvent conduire à développer son utilisation dans le cadre des ressources phylogénétiques.

Les facteurs du milieu modifiant la longévité naturelle du pollen sont bien connus : une faible teneur en eau, une réduction de la pression d'oxygène, un abaissement de la température de stockage. Mais il serait risqué d'extrapoler les résultats expérimentaux connus, car ils mettent surtout en lumière :

- la diversité des réponses à la dessiccation et aux basses températures avec les familles botaniques, les espèces et les génotypes considérés ;

- la réalisation de nombreux travaux descriptifs au détriment des approches multifactorielles et systématiques permettant de dégager des lois de comportement.

Les informations les plus intéressantes sont dues à une connaissance plus approfondie de l'évolution de la structure et de la physiologie du pollen avec la dessiccation. Le comportement du pollen est à rapprocher d'abord de sa constitution bi- ou trinuéclée. Une majorité d'Angiospermes possède un pollen binuéclé, à exine épaisse, qui supporte une dessiccation poussée (inférieure à 10%) et conserve une bonne viabilité ; par contre, le pollen trinuéclé montre une longévité réduite et une grande variabilité de réponse à la dessiccation qui serait en rapport avec la structure des membranes. De nombreuses espèces d'intérêt agronomique appartenant aux familles des Graminées, Chénopodiacées, Cruciféracées sont de ce type.

L'origine, la formation et la constitution de l'enveloppe du grain de pollen sont maintenant bien connues au niveau ultra-structure et histochimie chez *Triticum aestivum* (El Ghazaly et Jensen, 1986, 1987), *Secale cereale* (Heslop-Harrison, 1979) et différentes familles d'Angiospermes (Cerceau-Larrival et Challe, 1986). La conservation de l'intégrité des glycoprotéines d'origine sporophytique imprégnant l'exine paraît indispensable au maintien du système de reconnaissance et à la germination du pollen. Ces quelques exemples montrent l'intérêt d'une approche systématique permettant de définir des modèles et de trouver des relations entre les types de structures exiniques et aperturales avec

la conservation du pollen (Cauneau-Pigot, 1988).

De nombreuses expérimentations ont mis en évidence les effets de l'abaissement de la teneur en eau et de la température sur le maintien de la viabilité du pollen. Des améliorations dans la conservation du pollen sur de longues périodes sont intervenues principalement avec :

- le stockage à des températures inférieures à zéro degré, soit au congélateur ( $-10^{\circ}\text{C}$  à  $-30^{\circ}\text{C}$ ), soit avec des gaz liquéfiés (azote liquide) ;
- la déshydratation du pollen par dessiccation sous vide ou par lyophilisation, associée à un stockage en congélateur.

Le stockage du pollen au congélateur entre  $-10^{\circ}\text{C}$  et  $-30^{\circ}\text{C}$  après déshydratation à l'air sec permet de conserver pendant une à trois années de nombreuses espèces. Cependant les taux de survie varient largement avec les génotypes et les procédures.

Le maintien d'un très bon pourcentage de germination du pollen paraît assuré après un ou deux ans de stockage à des températures cryogéniques, en-dessous de  $-80^{\circ}\text{C}$  ; de tels résultats concernent aussi les céréales à pollen trinué. Cependant, les réponses à la cryogénie sont imprévisibles et les pertes de viabilité subites. Ces variations erratiques peuvent s'expliquer par un contrôle insuffisant des paramètres cryobiologiques comme la vitesse de congélation dans le cas de l'immersion directe dans le conteneur d'azote liquide, et la teneur en eau du pollen frais mis en congélation. Par exemple, le pollen de mélèze stocké à  $-196^{\circ}\text{C}$  garde une viabilité de 98% si la teneur en eau est comprise entre 10 et 30% ; elle chute rapidement dès que sa teneur en eau dépasse 40% (Ichikawa et Shidei, 1971). La perte de viabilité est en rapport avec la formation de glace : comme il y a peu d'eau libre visible en RMN dans le pollen déshydraté, les dégâts sont causés par la glace intracellulaire au cours du réchauffement. L'emploi de substances cryoprotectrices n'apporte pas d'amélioration.

Le contrôle de la dessiccation du pollen par lyophilisation ou par le vide favorise incontestablement le maintien des fonctions biologiques et la conservation. La teneur initiale en eau du pollen et la durée de lyophilisation affectent sa survie. La dessiccation doit être réalisée en un temps limité (une à deux heures) et ne pas dépasser le seuil critique de déshydratation (2% chez le pin, 4% chez le cocotier). La longévité du pollen lyophilisé est aussi accrue par stockage au congélateur ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) et sous une faible pression d'oxygène (vide ou azote). C'est dans ces conditions que les records de durée de conservation ont été obtenus (9 ans pour *Prunus persica* et 11 ans pour *Medicago sativa*). La banque des pollens du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris utilise ces technologies (Cerceanu-Larrival et Challe, 1986).

Il n'est pas utile de revenir sur les conditions d'évaluation de la viabilité du pollen. Sa mesure par la germination *in vitro* nécessite l'utilisation de milieux de culture adaptés et surtout une réhydratation préalable du pollen lyophilisé (Charpentier et Bonnet-Masimbert, 1983 ; Ganeshan et Alexander, 1986). La vraie valeur du pollen conservé est mise en évidence *in vivo* par la réussite des hybridations contrôlées (Parfitt et Almehdi, 1984). Son expression dépend de la compatibilité "pollen-stigmate" et des phénomènes de reconnaissance associés aux glycoprotéines de l'exine. Ainsi, chez *Clarkia*, après une pollinisation par du pollen inviable, l'apport immédiat de pollen viable n'induit

pas de fécondation ; s'il intervient au cours des jours suivants des graines sont produites (Smith-Huerta et Vasek, 1984). Enfin le pollen de *Brassica oleacea* viable, stocké dans l'azote liquide permet l'obtention de graines, mais elles possèdent une vigueur germinative réduite par rapport aux graines issues de pollen frais (Crisp et Grout, 1984).

En conclusion, les méthodologies de conservation du pollen ont progressé significativement avec le contrôle de la déshydratation et l'introduction de la cryogénie. La durée et la fiabilité du stockage se sont améliorées et autorisent la création de banques de pollen pour la conservation des ressources phylogénétiques. Elles sont surtout efficaces pour l'évaluation génétique des plantes ligneuses pérennes ; toutefois, la réalisation d'hybridations contrôlées avec diffusion du pollen n'est pas sans risque du point de vue sanitaire.

### BIBLIOGRAPHIE

- CANEAU-PIGOT A., 1988.- Biopaleontological study of *Lapageria rosea* Ruiz et Pav. and *Iris unguicularis* Poir. Storage pollen. *Grana*, **27**, 297 - 312.
- CERCEAU-LARRIVED M.-Th. et J. CHALLE., 1986.- Studies of the development of wheat (*Triticum aestivum*) pollen of stored pollen in some Angiosperm families. In : Pollen and Spores : Form and Function. S. Blackmore and I.K. Ferguson (Eds). Linn. Soc. Symp. ser., 12, 152 - 164. *Academic Press*, London.
- CHARPENTIER J.P. et M. BONNET-MASIMBERT, 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.
- CRISP P. et B.W.W. GROUT, 1984.- Storage of broccoli pollen in liquid nitrogen. *Euphytica*, **33**, 819 - 823.
- EL-GHAZALY G. et W.A. JENSEN, 1986.- Studies of the development of wheat (*Triticum aestivum*) pollen : formation of the pollen aperture. *Can. J. Bot.*, **64**, 3141 - 3154.
- EL-GHAZALY G. et W.A. JENSEN, 1987.- Development of wheat (*Triticum aestivum*) pollen. II.- Histochemical differentiation of wall and Ubisch bodies during development. *Am. J. Bot.*, **74** (9), 1396 - 1418.
- FRANKEL O.H. et J.G. HAWKES, 1975.- Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow. Cambridge, Cambridge University Press, 492 p.
- FRANKLIN E.C., 1981.- Pollen management handbook. USDA. Ed. Agriculture handbook n° 587.
- GANESHAN S. et M.P. ALEXANDER, 1986.- Effect of freeze-drying on pollen germination *in vitro* in Papaya (*Carica papaya* L. cv. Washington) and Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Arka Vikas). *Gartenbauwissenschaft*, **51** (1), 17 - 20.
- HESLOP-HARRISON J., 1979.- Aspects of the structure, cytochemistry and germination of the pollen rye (*Secale cereale* L.). *Ann. Bot.*, **44** (suppl.), 1 - 47.
- ICHIKAWA S. et T. SHIDEI, 1971.- Fundamental studies on deep-freezing storage of the tree pollen. *Kyoto Univ. For. Bull.*, **42**, 51 - 82.
- KARTHA K.K., 1985.- Cryopreservation of Plant Cells and Organs. Ed. CRC Press, Boca Raton (F) USA, 276 p.
- PARFITT E. et A.A. ALMEHDI, 1984.- Liquid nitrogen storage of pollen from five cultivated *Prunus* species. *HortScience*, **19** (1), 69 - 70.
- PERNES J., 1984.- Gestion des ressources génétiques des plantes. Tome 2, Manuel. Ed. Agence de Coopération Culturelle et Technique (ACCT), Paris, 346 p.
- SMITH-HUERTA N.L. et F.C. VASEK, 1984.- Pollen longevity and stigma pre-emption in *Clarkia*. *Amer. J. Bot.*, **71** (9), 1183 - 1191.
- VISSER T. et E.H. OOST, 1981.- Pollen and pollinisation experiments. III - The viability of apple and pear pollen as affected by irradiation. *Euphytica*, **30**, 65 - 70.