

Inhibition de germination du pollen *in vitro* pour caractériser l'auto-incompatibilité d'origine pistillaire chez l'olivier (*Olea europaea* L.)

Fathi Ben Amar ⁽¹⁾, Hammouda Arfa ⁽²⁾, Abdelmajid Yengui ⁽¹⁾, Hassan Belguith ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Institut de l'Olivier. Route de l'aéroport, km 1,5. BP 1087. TN-3000 Sfax (Tunisie). E-mail : fathibenamar@yahoo.fr

⁽²⁾ École Supérieure d'Agriculture de Mograne. TN-Zaghouan (Tunisie).

Reçu le 2 juin 2012, accepté le 2 octobre 2012.

La compatibilité pollinique *in vitro* des deux variétés d'olive de table 'Meski' (Tunisie) et 'Picholine' (France) a été étudiée pour cinq arbres conduits en irrigué. L'évaluation montre que 'Picholine' est plus performante au niveau du taux de germination des grains de pollen sur milieu de culture standard avec 86,4 %. Le test d'autocompatibilité montre que le pollen de 'Meski' manifeste une baisse du taux de germination qui passe de 44,8 à 21 % en présence de son broyat pistillaire dans le milieu, alors que 'Picholine' montre des valeurs inchangées, voire augmentées (passage de 76 à 87 %) en présence de son broyat pistillaire. Le pollen de 'Picholine' présente un taux de germination plus élevé en présence du broyat 'Meski' avec 77,6 %, ce qui reflète bien l'intercompatibilité de 'Meski'. L'addition des composés phénoliques extraits du pistil de 'Meski', à des concentrations différentes dans le milieu, montre que le taux de germination le plus faible des grains de pollens de 'Meski' (9,7 %) a été obtenu à la concentration la plus élevée C3 (2,826 mg·ml⁻¹). L'effet inhibiteur de cette concentration est significativement plus faible sur les grains de pollen de 'Picholine' avec 45 %.

Mots-clés. *Olea europaea*, essai de variété, pollen, germination du pollen, composé phénolique, *in vitro*, Tunisie.

Inhibition of *in vitro* pollen germination to characterize the pistil origin of the autoincompatibility of olive (*Olea europaea* L.). The *in vitro* pollen compatibility of the two table olive varieties 'Meski' (Tunisia) and 'Picholine' (France) was studied for five trees under irrigated conditions. Evaluation of the results demonstrated that 'Picholine' had the highest germination rate of pollen grains on standard culture medium at 86.4%. The autocompatibility test for 'Meski' showed a decrease in the germination rate from 44.8 to 21% when pollen grains were placed on a medium containing its pistil mixture. 'Picholine', meanwhile, exhibited stable or even decreased values ranging from 76 to 87% with its own pistil mixture. The 'Picholine' pollen exhibited its highest germination rate (77.6%) in the medium containing the 'Meski' pistil mixture, indicating the intercompatibility of 'Meski'. The addition to the medium of phenolic components extracted from 'Meski' pistils at three concentrations showed that the lowest germination rate of 'Meski' pollen grains (9.7%) was obtained at the highest concentration, C3 (2.826 mg·ml⁻¹). The inhibitory effect of this concentration was significantly lower on the 'Picholine' pollen grains at 45%.

Keywords. *Olea europaea*, variety trials, pollen, pollen germination, phenolic compounds, *in vitro*, Tunisia.

1. INTRODUCTION

L'olivieraie de table en Tunisie est dominée par la variété locale 'Meski' et celle introduite, 'Picholine', française. 'Meski' est la plus cultivée mais connaît des problèmes au niveau de l'autocompatibilité pollinique (Mehri et al., 1995a) puisque le taux d'autocompatibilité *in vivo* est évalué à 0,83 % seulement (Mehri et al., 1995b). 'Picholine' est reconnue être une variété autocompatible et est l'une des bonnes variétés pollinisatrices de 'Meski' (Mehri et al., 2003) puisque

le degré d'intercompatibilité pollinique *in vivo* de 'Meski' avec le pollen de 'Picholine' s'élève à 45 % (Mehri et al., 2002).

La stérilité florale chez l'olivier semble être due à une auto-incompatibilité gamétophytique identique à celle de la variété espagnole 'Manzanilla' (Cuevas et al., 1997) et à une stérilité morphologique de l'ovaire de certaines fleurs appelée encore avortement pistillaire (Rallo et al., 1981) qui fait de l'olivier une espèce andromonoïque. Pour le cas de la fleur de 'Meski', le tube pollinique n'arrive pas à atteindre

l'ovaire après germination (Mehri et al., 2003). D'autre part, le cas des fleurs femelles chez l'olivier (absence des anthères) n'a pas été rapporté (COI, 1997).

Les mécanismes de l'auto-incompatibilité sont assez divers. Selon Kammoun (1982), l'un des facteurs pouvant influencer la germination des grains de pollen est le broyat pistillaire. Ainsi, Lavee et al. (1978) ont affirmé que la germination des grains de pollen de l'olivier est plus active quand le milieu contient des stigmates écrasés. D'après ces mêmes auteurs, il y a un chimiotropisme positif du pollen vers les organes floraux (style-ovaire) dans le cas de l'autocompatibilité. Coutaud (1954), ayant travaillé sur la pollinisation du pommier, a conclu que l'addition au milieu de germination des stigmates appartenant à une variété triploïde occasionne une diminution du pourcentage de germination. De même, Kammoun (1982) a montré que le broyat pistillaire de la variété 'Meski' a inhibé la germination des grains de pollen et la croissance du tube pollinique de la même variété. En plus, un renflement de l'extrémité des tubes a été signalé sur milieu artificiel, ce qui indique l'existence d'une auto-incompatibilité partielle chez cette variété (Kammoun, 1982).

L'effet des polyphénols sur la floraison et le développement et la maturation du fruit ont été rapportés par Ryan et al. (2003). D'autre part, Malik et al. (2006) ont suivi la concentration des polyphénols durant la différenciation et le développement des bourgeons à fleurs et ont rapporté une augmentation du taux d'aleuropéine (principal composé phénolique biologiquement actif de l'olive) au moment de l'allongement des pistils fécondés. Ces constatations peuvent être à l'origine du phénomène de l'auto-incompatibilité pollinique chez l'olivier.

La présente communication se propose d'étudier d'une part l'inhibition pistillaire de la germination pollinique *in vitro* des variétés d'olive de table 'Meski' et 'Picholine' et d'autre part, l'effet de la concentration en polyphénols des pistils sur le phénomène d'incompatibilité.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude a été menée sur cinq arbres en floraison des deux variétés 'Meski' et 'Picholine'. Tous les tests et les préparations de l'étude sont effectués par arbre. Pour chaque arbre, on a prélevé des fleurs au stade bouton blanc (juste avant le début de l'ouverture des fleurs) et, au laboratoire, on a prélevé les grains de pollen des anthères selon le protocole de Kammoun (1982). La germination des grains de pollen est effectuée dans des boîtes de Petri contenant un milieu standard préparé avec 10 % de saccharose, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d'acide borique et 0,5 % d'agar incubé à 25 °C à l'obscurité (Mehri et al.,

1995b). Sous hotte à flux laminaire, on enseme des grains de pollen sur la boîte de Petri qui séjourne 48 h dans une chambre de culture (à 25 °C et à l'obscurité). Un grain de pollen est germé lorsque la longueur de son tube pollinique est supérieure à son diamètre. Pour chaque arbre, deux boîtes de Petri sont préparées et le comptage est effectué sur un total de 200 grains de pollen. Le taux de germination est calculé par la formule suivante : (nombre de pollens germés/200) * 100. Ce taux est déterminé pour deux types de facteurs :

- effet du broyat pistillaire (autocompatibilité et intercompatibilité) : le broyat pistillaire a été préparé en collectant des pistils (ovaire + style + stigmate) des fleurs de chaque arbre au stade bouton blanc et en broyant 2 g de pistils avec 4 ml d'eau. On a réalisé *in vitro* trois essais différents, à savoir un essai de germination des grains de pollen des deux variétés sur milieu de culture standard (T1 = témoin), un essai de germination des grains de pollen sur milieu standard auquel on a ajouté le broyat des pistils de la même variété (T2 = autocompatibilité) et un essai de germination des grains de pollen de la variété 'Picholine' sur milieu contenant le broyat pistillaire de la variété 'Meski' (T3 = intercompatibilité) ;
- effet des composés phénoliques de 'Meski' : dans le but de mieux comprendre le phénomène d'auto-incompatibilité chez la variété 'Meski' et de son lien avec la teneur en composés phénoliques, on a procédé à deux opérations. La préparation des extraits des pistils consiste à collecter les pistils de chaque arbre, les broyer, mélanger 20 g du broyat avec 40 ml de méthanol, mettre le mélange sous agitation durant 24 h à l'abri de la lumière et le centrifuger à 13000 $\text{t}\cdot\text{min}^{-1}$ durant 15 min pour séparer les particules en suspension du surnageant. Le surnageant récupéré subit une évaporation à rotation sous vide à une température de 60 °C durant presque 2 h. L'extrait sec obtenu est conservé dans des tubes à hémolyses à 4 °C et à l'abri de la lumière. Le dosage des composés phénoliques totaux de l'extrait obtenu selon le protocole de Kähkönen et al. (1999) a été déterminé par l'absorbance à 760 nm mesurée par un spectrophotomètre. La teneur totale en composés phénoliques, exprimée en milligrammes par gramme de matière sèche, est calculée à partir de la formule suivante :

$$A_{760\text{ nm}} = 0,039 * C + 0,0049 \text{ (Slinkard et al., 1977)}$$

où $A_{760\text{ nm}}$ est l'absorbance et C, la teneur totale en composés phénoliques ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

Deux essais sont réalisés. Pour 'Meski', les grains de pollen sont ensemenés sur des milieux contenant trois concentrations différentes de composés phénoliques.

La concentration est exprimée en $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de milieu de culture et le poids des composés phénoliques à ajouter au milieu est calculé à partir de la concentration de l'extrait sec en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche (C). Il s'agit des concentrations $C1 = 0,0282 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $C2 = 0,2826 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ et $C3 = 2,826 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pour la germination du pollen de 'Picholine', on a testé uniquement l'effet de la concentration C3 en composé de 'Meski' qui a fortement inhibé la germination des grains de pollen de 'Meski'.

Les analyses de variance du taux de germination ont été réalisées par le logiciel SPSS version 11.0 et sont de deux types : analyse à deux facteurs croisés avec interaction (facteurs variété et traitements T1 et T2) et analyse à un seul facteur pour l'intercompatibilité (facteur traitement) et pour l'effet des composés phénoliques (facteur concentration). Dans tous les essais, le nombre d'arbres représente les répétitions (5). La comparaison des moyennes a été faite par le test de Duncan aux seuils de 5 et 1 % et chaque moyenne est accompagnée par l'écart-type correspondant.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Effet du broyat pistillaire

Selon le **tableau 1**, la variété 'Meski' manifeste une baisse significative du taux de germination des grains de pollen sur un milieu de culture en l'absence et en présence de son broyat pistillaire qui passe de 44,8 à 21 %, alors que la variété 'Picholine' manifeste des valeurs statistiquement similaires qui passent de 86,4 à 76,1 %.

L'interaction variété x traitement montre clairement que la variété 'Meski' pose un problème d'auto-incompatibilité pollinique qui n'existe pas chez la variété 'Picholine', comme rapportée par Kammoun (1982), Mehri et al. (1995a) et Mehri et al. (2003).

La chute du taux de germination de 'Meski' en passant des traitements 1 à 2 est plus importante que pour 'Picholine', d'autant plus que ce taux arrive à une valeur très faible par rapport à 'Picholine'. Ainsi, on peut avancer que l'auto-incompatibilité de 'Meski' est partielle, puisqu'il y a une germination sur milieu contenant son broyat pistillaire.

La germination des tubes polliniques de 'Picholine' sur le milieu contenant l'extrait de 'Meski' engendre un taux de germination *in vitro* des pollens de 'Picholine' de 77,6 %. Ce taux est similaire à celui obtenu par la germination des tubes polliniques de 'Picholine' sur le milieu contenant son extrait (76,1 %), mais significativement supérieur à celui obtenu par l'autofécondation de 'Meski' (21 %) (**Tableau 1**). Ce traitement confirme les conclusions avancées par Mehri et al. (2002) et Mehri et al. (2003) concernant

Tableau 1. Taux de germination des grains de pollen (%) des variétés 'Meski' et 'Picholine' pour trois traitements T1, T2 et T3 — *Germination rate of pollen grains (%) of varieties 'Meski' and 'Picholine' for treatments T1, T2 and T3.*

Traitement\Variété	'Meski'	'Picholine'
T1	44,8 ± 10,4 ^b	86,4 ± 2,9 ^a
T2	21,0 ± 6,0 ^c	76,1 ± 25,7 ^a
T3	-	77,6 ± 4,6 ^a

T1 : témoin : milieu standard — *control: standard medium* ; T2 : autocompatibilité : milieu standard + broyat de pistils de la même variété — *autocompatibility: standard medium + pistil mixture of the same variety* ; T3 : pollinisation croisée par 'Picholine' : milieu standard + broyat de pistils de la variété 'Meski' — *cross pollination with 'Picholine': standard medium + pistil mixture of 'Meski' variety* ; les valeurs de chaque facteur suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % — *values of each factor followed by the same letter are not significantly different at level 5%.*

la compatibilité entre 'Meski' en tant que femelle et 'Picholine' en tant que mâle. D'autre part, ce traitement pourrait expliquer la nécessité de la présence d'un pollinisateur issu d'une variété différente dans les parcelles de 'Meski' et l'aptitude de 'Picholine' à remplir ce rôle, comme avancé par Kammoun (1982) et Mehri et al. (2003).

3.2. Effet des composés phénoliques de 'Meski'

L'effet des composés phénoliques sur la germination des grains de pollen de 'Meski' est variable selon leur concentration (**Tableau 2**). En effet, les concentrations C1 et C2 donnent des taux de germination similaires

Tableau 2. Taux de germination des grains de pollen (%) des variétés 'Meski' et 'Picholine' en fonction de trois concentrations des composés phénoliques extraits de leurs pistils dans le milieu — *Germination rate of pollen grains (%) of 'Meski' and 'Picholine' varieties regarding three concentrations of phenolic components extracted from their pistil in the medium.*

Concentration	C1	C2	C3
'Meski'	48,3 ± 3,2 ^a	46,1 ± 10,0 ^a	9,7 ± 4,1 ^b
'Picholine'	-	-	44,9 ± 5,7 ^a

C1, C2, C3 : concentrations ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) en composés phénoliques extraits des pistils de 'Meski' dans le milieu, respectivement 0,0282 ; 0,2826 et 2,826 — *concentrations ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) of extracted phenolic components from 'Meski' in the medium, respectively 0.0282 ; 0.2826 and 2.826* ; les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % — *values followed by the same letter are not significantly different at level 5%.*

avec respectivement 48,3 et 46,1 %. Ces taux sont plus élevés que celui obtenu pour la concentration C3 qui est de 9,7 %. Les résultats obtenus montrent que l'effet des composés phénoliques sur la germination des grains de pollen de 'Meski' n'est pas significatif à des concentrations assez faibles. D'ailleurs, le comportement de 'Meski' avec les deux concentrations C1 et C2 est comparable à celui dans le milieu témoin. Par conséquent, on peut avancer que les composés phénoliques sont présents dans le pistil de 'Meski' à une concentration bien déterminée, qui peut expliquer l'auto-incompatibilité pollinique de cette variété. Cette hypothèse rejoint l'idée avancée par Aouini (2006) qui repose sur le rejet du pollen par des moyens cytotoxiques.

La comparaison de l'effet de la concentration C3 sur 'Meski' avec celui du broyat pistillaire prouve que la concentration C3 en composés phénoliques est peut-être plus élevée que dans le broyat. C'est ce qui explique la différence des taux de germination obtenus, respectivement 9,7 et 21 %.

À la concentration la plus élevée C3, les grains de pollen de la variété 'Picholine' ont un taux de germination plus élevé (44,9 %) que celui de la variété 'Meski' (9,7 %) (**Tableau 2**). Ce résultat prouve que les composés phénoliques présents dans le pistil de la variété 'Meski' ont un effet inhibiteur sur la germination beaucoup plus important sur 'Meski' que sur 'Picholine'. Par conséquent, on peut parler d'une sensibilité plus élevée des pollens de 'Meski' vis-à-vis des composés phénoliques, c'est ce qui explique la chute du taux de germination des pollens de 'Picholine' de 86,4 % au traitement témoin T1 à 44,9 % à la concentration C3 en composés phénoliques. Cette différence entre les deux variétés au niveau de la sensibilité peut avoir une relation avec l'idée postulée par Lavee et al. (1978) concernant l'aspect génétique et celle de Aouini (2006) concernant l'aspect chimique de la compatibilité pollinique.

L'étude de l'effet des composés phénoliques du pistil de 'Meski' génère en fait deux effets simultanés. Il s'agit d'un effet quantitatif (concentration) et d'un effet qualitatif (reconnaissance variétale).

4. CONCLUSION

Cette étude *in vitro* confirme le caractère auto-incompatible chez la variété 'Meski', qui nécessite par conséquent un pollinisateur potentiel. Ce rôle peut être assumé par la variété 'Picholine' caractérisée par une sensibilité moins importante de son pollen *in vitro* vis-à-vis des extraits pistillaires de 'Meski'. Les composés phénoliques impliqués dans l'auto-incompatibilité de 'Meski' doivent être identifiés sur le plan biochimique et quantifiés de façon précise. La détermination

quantitative et qualitative des composés phénoliques peut être un outil de sélection précoce dans les programmes d'amélioration en cours (sélection clonale et hybridations) chez la variété 'Meski'. D'autre part, le déterminisme de la reconnaissance entre les composés phénoliques et les grains de pollen doit être élucidé.

Remerciements

Les auteurs remercient le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique de Tunisie (Université de Sfax) et l'Institution de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur Agricole (IRESA) pour leur financement de l'étude et tout le personnel de la ferme privée à Bouladhieb, dans la région de Sfax, pour leur collaboration.

Bibliographie

- Aouini A., 2006. *Contribution à l'étude des potentialités végétative, reproductrice, pomologique, technologique et biochimique de quelques variétés d'oliviers récemment introduites en Tunisie et cultivées en hyperintensif*. Mastère : Institut National Agronomique de Tunisie, Tunis (Tunisie).
- COI, 1997. *Encyclopédie mondiale de l'olivier*. Madrid : Édition Conseil Oléicole International.
- Coutaud L., 1954. Contribution à l'étude de la fécondation et de la fructification chez le pommier. *Ann. Amélior. Plantes*, **4**, 51-127.
- Cuevas J. & Polito V.S., 1997. Compatibility relationships in 'Manzanillo' olive. *Hortscience*, **32**(6), 1056-1058.
- Kähkönen M.P. et al., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3954-3962.
- Kammoun R., 1982. *Contribution à l'étude de la biologie florale de l'olivier (Olea europaea L.). Mise en évidence de l'auto-incompatibilité chez la variété 'Meski'*. Mémoire de fin d'études (cycle de spécialisation) : Institut National Agronomique de Tunisie, Tunis (Tunisie).
- Lavee S. & Datt Z., 1978. The necessity of cross pollination for fruit set of 'Manzanillo' olives. *J. Hort. Sci.*, **53**(4), 261-266.
- Malik N.S.A. & Bradford J.M., 2006. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Sci. Hort.*, **110**(3), 274-278.
- Mehri H. & Hellali R., 1995a. *Étude pomologique des principales variétés d'olives cultivées en Tunisie*. Document technique. Sfax, Tunisie : Institut de l'Olivier.
- Mehri H. & Kammoun-Mehri R., 1995b. Biologie florale de l'olivier : problème de l'auto-incompatibilité chez la variété 'Meski' et recherche de pollinisateurs. *Olivae*, **55**, 35-39.
- Mehri H., Msallem M., Mehri-Kamoun R. & Msallem J., 2002. Étude des potentialités végétatives et des autocompatibilités de 8 variétés d'oliviers. *Ann. INRGREF*, **5**, 115-131.

- Mehri H. et al., 2003. Reproductive behaviour of six olive cultivars as pollenizer of the self-incompatible olive cultivar Meski. *Adv. Hortic. Sci.*, **17**(1), 42-46.
- Rallo L., Martin G.C. & Lavee S., 1981. Relationships between abnormal embryo sac development and fruitfulness in olive fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **106**, 813-817.
- Ryan D. et al., 2003. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of olive (*Olea europaea*) cultivar 'Hardy's Mammoth'. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2532-2538.
- Slinkard K. & Singleton V.L., 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Ecol. Vitic.*, **28**, 49-55.

(15 réf.)