

Optimisation des conditions de germination *in vitro* du pollen de cocotier (*Cocos nucifera* L.) pour la mise au point d'un test de viabilité

J. L. VERDEIL (1) et C. PANNETIER (2)

Résumé. — Cette étude a pour but de préciser les facteurs de la germination *in vitro* du pollen de cocotier. Elle porte essentiellement sur la teneur en eau des grains de pollen, la composition minérale du milieu, sa concentration en glucose et son pH. Elle met en évidence la grande sensibilité du pollen de cocotier vis-à-vis du pH du milieu de germination (pH optimum 5,5), l'importance de la pression osmotique du milieu (concentration optimale en glucose, voisine de $110 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), l'effet stimulant de deux cations : l'ion Ca^{++} et l'ion Mg^{++} et l'influence du degré d'hydratation du pollen sur sa germination. D'un point de vue pratique, l'ensemble des données acquises permet de définir un milieu de germination adapté au pollen de cocotier. Sa composition et le mode d'ensemencement des grains de pollen sont précisés.

INTRODUCTION

La pollinisation dirigée utilisée pour la production de semences hybrides de cocotier demande de disposer en grande quantité d'un pollen de qualité.

La technique de récolte et de stockage du pollen de cocotier mise au point par Rognon et de Nuce de Lamothe (1978) permet son stockage, son transport et sa conservation pour une utilisation planifiée en fonction des besoins. La viabilité du pollen estimée par son pourcentage de germination *in vitro* doit pouvoir être contrôlée tout au long de cette filière de façon à déceler les accidents éventuels et garantir la qualité du produit final.

Peu de données sont disponibles sur la composition des milieux de germination adaptés au pollen de cocotier. Aldaba (1921) préconise une solution à $250\text{-}300 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de saccharose et $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de gélatine. D'après Patel (1938) la germination est meilleure sur un milieu contenant $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de sucre et $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de gélatine. Par ailleurs, dans les différentes stations de sélection avec lesquelles nous collaborons les résultats obtenus sur un milieu agar-saccharose ($12 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}/120 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) sont très variables en fonction de la marque et parfois même du lot d'agar utilisé.

Face à ces données divergentes, des essais ont été menés de façon à préciser les facteurs de la germination du pollen de cocotier. Notre étude porte sur la teneur en eau des grains de pollen, la concentration en glucose, la composition minérale du milieu et son pH.

Concernant la composition minérale, différents sels minéraux connus pour stimuler la germination des pollens ont été testés : l'acide borique (Gauch et Ouggar, 1953), le nitrate de calcium (Brewbaker et Kwack, 1963), le nitrate de potassium et le sulfate de magnésium (Dexheimer, 1970).

L'objectif de notre étude étant limité à l'estimation de la viabilité du pollen de cocotier par mesure de sa capacité de germination sur un milieu simple, l'influence de substances complexes telles que les acides aminés, les vitamines ou encore les phytohormones, n'a pas été testée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

a — Matériel végétal.

Le pollen a été récolté à la station de Pobé (Bénin) sur des individus hybrides Nain Jaune Malais \times Grand Ouest Africain (hybride PB121 créé par l'IRHO).

Il est déshydraté et conditionné sous vide suivant la technique décrite par Rognon et de Nuce de Lamothe (1978).

b — Conduite des essais.

— Solution minérale.

Pour chaque sel minéral testé (H_3BO_3 ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; KNO_3 ; MgSO_4), des essais préliminaires réalisés à partir des principales données bibliographiques ont permis de déterminer une concentration de base permettant une germination acceptable du pollen de cocotier :

Milieu minéral de base :

$$[\text{H}_3\text{BO}_3] = 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}; [\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4 \text{ H}_2\text{O}] = 300 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1};$$

$$[\text{KNO}_3] = 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}; [\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}] = 200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}.$$

Nous avons fait varier la concentration de chacun des sels minéraux pris isolément, suivant une gamme en maintenant constantes les concentrations des trois autres sels (concentration du milieu minéral de base).

— Influence de la teneur en eau, du pH et de la concentration en glucose.

L'influence de la teneur en eau des grains de pollen, du pH et de la concentration en glucose ont été étudiées en utilisant le milieu minéral de base.

Chaque essai a été répété au moins deux fois, sur deux lots de pollen différents.

c — Réalisation des mesures.

— Mesure de la teneur en eau du pollen.

La teneur en eau du pollen est déterminée à l'ouverture des flacons scellés. Elle est également calculée après réhydra-

(1) IRHO-CIRAD, Laboratoire de culture *in vitro* de l'ORSTOM, 2051, avenue du Val-de-Montferand, B.P. 5045 34032 Montpellier Cedex.

(2) IRHO-CIRAD, Laboratoire de biologie cellulaire, INRA Centre de Versailles, 78026 Versailles Cedex

tation du pollen ; la réhydratation ayant lieu sous atmosphère saturée en vapeur d'eau et pendant des durées variables.

Le poids sec d'une quantité donnée de pollen est mesuré après dessiccation pendant 48 heures dans une étuve sèche réglée à 110 °C.

— Détermination des pourcentages de germination.

● **Ensemencement du pollen :** 20 mg de pollen (quantité mesurée à l'ouverture des flacons) sont ensemencés dans une boîte de pétri jetable de 60 mm de diamètre contenant 20 ml de milieu de culture liquide.

De façon à limiter l'effet densité, les essais ont été réalisés en milieu liquide (répartition des grains de pollen plus homogène qu'en milieu gélosé). La densité de pollen (1 mg/ml de milieu) est maintenue constante dans chaque essai.

Les boîtes ensemencées sont placées dans une étuve à 28 °C ± 1 °C pendant 2 heures.

● **Comptage des grains de pollen germés :** le pourcentage de germination est calculé deux heures après la mise en culture.

Pour chaque boîte ensemencée, 600 grains sont comptés directement dans les boîtes à l'aide d'un microscope à inversion. Les grains de pollen germés sont dénombrés au moyen d'un compteur mécanique digital.

Pour chaque lot, et pour chaque variante de milieu, 4 boîtes sont ensemencées. Une moyenne est effectuée sur l'ensemble des 4 valeurs.

RÉSULTATS

a — Influence de la teneur en eau du pollen.

● Cinétique de réhydratation.

L'évolution de la teneur en eau du pollen en fonction de la durée de réhydratation sous une atmosphère saturée en vapeur d'eau est représentée sur la figure 1 (moyennes et écarts-type calculés sur 12 lots de pollen).

La cinétique de réhydratation montre une évolution très rapide de la teneur en eau durant les 4 premières heures (augmentation de 7,8 % entre t_0 et $t_0 + 4$ h). La réhydratation est beaucoup plus lente au-delà de la quatrième heure (augmentation de 7,42 % entre la 4^e et la 20^e heure).

● Evolution du pourcentage de germination.

Le prétraitement sous atmosphère saturée permettant la réhydratation du pollen, facilite sa germination. Une durée de réhydratation de 2 à 6 heures (teneur en eau de 8 à 13 %) rend la germination meilleure par rapport à celle obtenue sur pollen sec (4 % d'humidité), taux de germination 3,5 fois plus élevé en moyenne que pour le pollen sec. Fig. 1.

Le pollen réhydraté sous atmosphère saturée pendant 20 heures (teneur en eau moyenne de 19 %) germe moins bien que le pollen réhydraté pendant 6 heures (13 % d'eau), (taux de germination de 21,5 % au lieu de 49 %).

Une estimation de la viabilité du pollen mesurée à l'aide du test colorimétrique au chlorure de tétrazolium (Oberle et Watson, 1953) donne un taux de mortalité de 46,8 % après 20 heures d'hydratation sous atmosphère saturée. Ce même taux n'est que de 24,5 % sur pollen hydraté pendant 6 heures (taux de mortalité non significativement différent de celui du pollen sec).

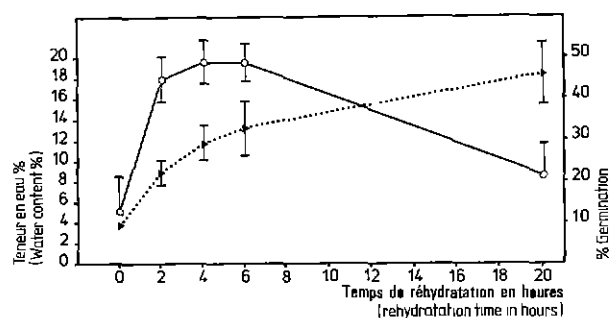


FIG 1 — ► Cinétique de la réhydratation du pollen de cocotier
○ Influence de la teneur en eau sur le taux de germination. Ecart-type calculé sur 12 lots de pollen — (► Coconut pollen rehydration kinetics ○ Effect of water content on germination rate. Standard deviation calculated using 12 pollen batches)

b — Influence de la concentration en glucose.

L'influence de la concentration en glucose sur la germination du pollen de cocotier a été testée après réhydratation pendant 2 heures sous atmosphère saturée.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 2. Le graphe met en évidence l'existence d'une concentration optimale de glucose se situant au voisinage de 120 g·l⁻¹.

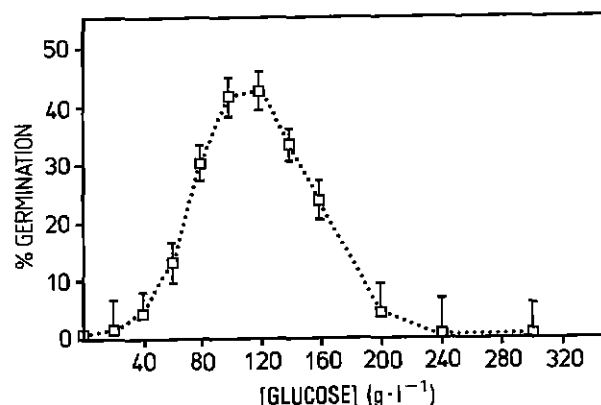


FIG 2. — Influence de la concentration en glucose sur la germination du pollen de cocotier. □ Pollen réhydraté. Ecart-type calculé sur 4 boîtes. — (Effect of glucose concentration on Coconut pollen germination □ Rehydrated pollen. Standard deviation calculated using 4 dishes) a = % germination

En dessous de 60 g·l⁻¹, le milieu de germination est hypotonique, l'eau pénètre dans les grains. L'hypertrophie de la majorité d'entre eux conduit à leur éclatement.

La croissance des tubes polliniques des grains qui réussissent à germer aux fortes concentrations en glucose (140, 160 et 200 g·l⁻¹) est beaucoup plus faible qu'à 120 g·l⁻¹. A ces concentrations, la majorité des grains de pollen germés sont plasmolysés.

A 340 g·l⁻¹, la pression osmotique du milieu est telle que les grains n'absorbent pas, ou pratiquement pas, d'eau (ils ont une forme en grain de café qui rappelle les grains de pollen déshydratés).

Ainsi la concentration en glucose agit non seulement sur le pourcentage de germination mais également sur la morphologie et la croissance des tubes polliniques de cocotier, les sucres intervenant sur la pression osmotique et comme substrat carboné utilisé dans les réactions de synthèse des composés pariétaux (Labarca et Loewus, 1972).

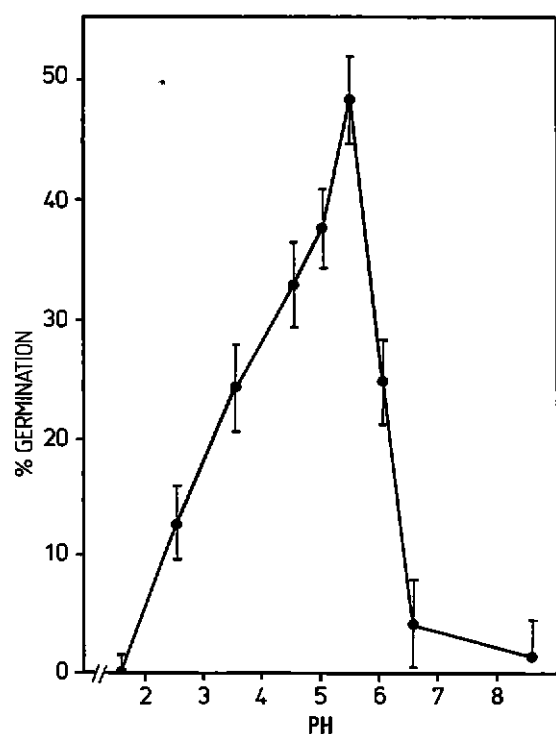


FIG. 3 — Influence du pH sur la germination du pollen de cocotier. ● Pollen réhydraté. Ecart-type calculé sur 4 boîtes — (Effect of pH on coconut pollen germination. ● Rehydrated pollen. Standard deviation calculated using 4 dishes). a = % germination

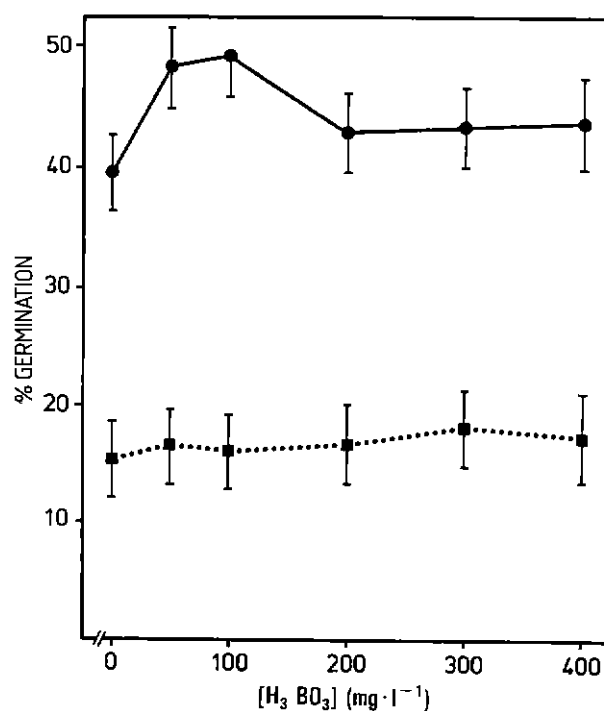


FIG. 4. — Influence de la concentration en acide borique sur la germination du pollen de cocotier. ● Pollen réhydraté, ■ pollen non réhydraté. Ecart-type calculé sur 4 boîtes — (Effect of boric acid concentration on coconut pollen germination. ● Rehydrated pollen, ■ non-rehydrated pollen. Standard deviation calculated using 4 dishes). a = % germination

c — Influence du pH du milieu de germination.

Le graphe représenté sur la figure 3 montre l'influence très marquée du pH sur la germination du pollen de cocotier.

La germination est optimale à pH = 5,5. Cet optimum est très étroit ; lorsque le pH augmente d'une unité (pH = 6,5), le taux de germination passe de 48,2 à 25 %. Pour un pH de 4,5 le taux de germination n'est que de 32,3 %.

Le milieu utilisé n'étant pas tamponné, son pH peut être modifié au cours de l'autoclavage et au cours de sa conservation. La germination du pollen de cocotier étant très sensible aux variations de pH, il apparaît indispensable de vérifier le pH juste avant l'ensemencement (ajustement du pH à 5,5).

La sensibilité du pollen de cocotier vis-à-vis du pH peut expliquer les différences obtenues en fonction de la marque d'Agar utilisé (le pH d'un milieu gélosé pouvant varier de plus d'une unité suivant le degré de pureté de l'agar utilisé).

d — Influence de la solution minérale.

L'influence de chaque sel minéral sur le pourcentage de germination en fonction de sa concentration dans le milieu est représentée sur les figures 4, 5, 6 et 7.

Trois des quatre sels minéraux testés ont une nette influence sur le taux de germination : le nitrate de calcium, le sulfate de magnésium et l'acide borique.

Pour chacun de ces trois sels, une concentration optimale peut être retenue :

$$\begin{aligned} [\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4 \text{H}_2\text{O}] &= 300 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} ; \\ [\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}] &= 200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} ; \\ [\text{H}_3 \text{BO}_3] &= 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} . \end{aligned}$$

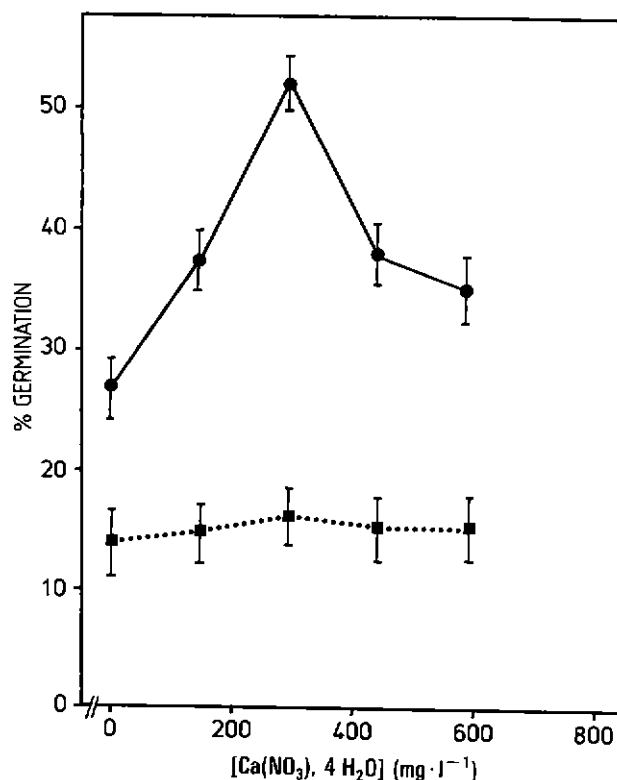


FIG 5 — Influence de la concentration en nitrate de calcium sur la germination du pollen de cocotier. ● Pollen réhydraté, ■ pollen non réhydraté. Ecart-type calculé sur 4 boîtes — (Effect of calcium nitrate concentration on coconut pollen germination. ● Rehydrated pollen, ■ non-rehydrated pollen. Standard deviation calculated using 4 dishes)

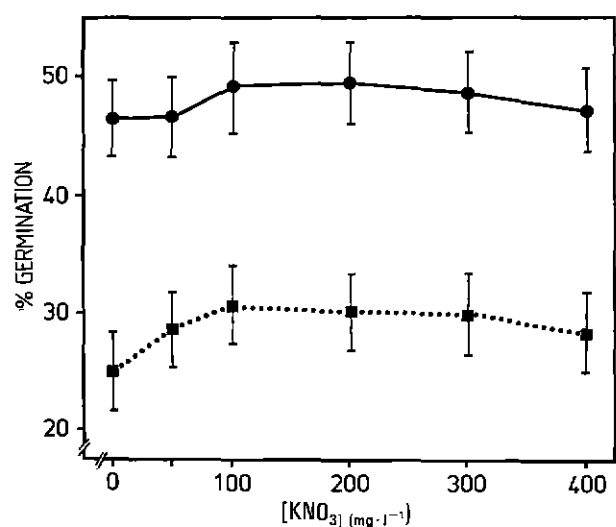


FIG 6. — Influence de la concentration en nitrate de potassium sur la germination du pollen de cocotier ● Pollen réhydraté, ■ pollen non réhydraté. Ecart-type calculé sur 4 boîtes. — (Effect of potassium nitrate concentration on coconut pollen germination. ● Rehydrated pollen, ■ non-rehydrated pollen. Standard deviation calculated using 4 dishes)

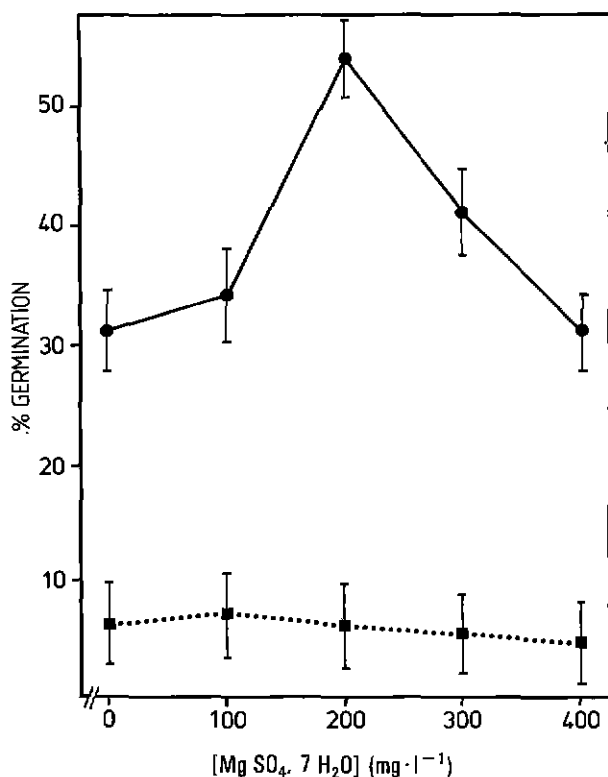


FIG 7. — Influence de la concentration en sulfate de magnésium sur la germination du pollen de cocotier ● Pollen réhydraté, ■ pollen non réhydraté. Ecart-type calculé sur 4 boîtes. — (Effect of magnesium sulphate concentration on coconut pollen germination. ● Rehydrated pollen, ■ non-rehydrated pollen. Standard deviation calculated using 4 dishes).

Aux fortes concentrations (concentrations respectivement supérieures à 300 mg.l⁻¹ et à 400 mg.l⁻¹) le sulfate de magnésium et le nitrate de calcium ont un effet inhibiteur sur la germination et la croissance des tubes polliniques.

A l'inverse, l'acide borique stimule la croissance des tubes polliniques pour des concentrations supérieures à

200 mg.l⁻¹ ce qui rend les comptages plus difficiles (tubes polliniques entrecroisés). La concentration de 100 mg.l⁻¹ d'acide borique, qui stimule la germination tout en permettant un comptage facile sera retenue.

Aux concentrations de 0 à 400 mg.l⁻¹ et dans les conditions où il a été testé, le nitrate de potassium n'a pas d'influence significative sur la germination du pollen de cocotier hydraté. Sa suppression pourrait conduire à une simplification de la solution minérale mais au préalable il serait souhaitable de tester ses interactions éventuelles avec l'ion calcium et l'ion magnésium (les effets stimulants de ces deux cations ayant été mis en évidence en présence de KNO₃ à 200 mg.l⁻¹).

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'ensemble des essais réalisés permettent de mieux cerner les facteurs essentiels pour la germination du pollen de cocotier :

- nécessité d'une réhydratation sous une atmosphère saturée en vapeur d'eau à l'ouverture des flacons contenant le pollen,
- grande sensibilité vis-à-vis du pH du milieu de germination (pH optimum de 5,5),
- importance de la pression osmotique du milieu (concentration optimale en glucose comprise entre 100 et 120 g.l⁻¹),
- influence stimulatrice de deux cations : l'ion Ca⁺⁺ et l'ion Mg⁺⁺ apportés sous forme de nitrate de calcium et de sulfate de magnésium,
- apport bénéfique d'acide borique.

La stimulation de la germination par une réhydratation préalable du pollen est à rapprocher des observations faites sur le palmier à huile par Buffard-Morel *et al.* (1964) qui soulignent l'influence bénéfique de l'ouverture des flacons scellés, quelques heures avant l'ensemencement.

Ce résultat semble généralisable à l'ensemble des pollens stockés qui sont déshydratés artificiellement de façon à faciliter leur conservation (Johri et Vasil, 1961, revue générale) (le pollen de cocotier se conserve bien sous vide lorsque sa teneur en eau ne dépasse pas 6 %).

Il est intéressant de noter que l'influence de la réhydratation du pollen sur sa germination n'est efficace que si elle est effectuée en atmosphère gazeuse. Du pollen réhydraté par immersion dans de l'eau ou dans du milieu de germination liquide (anoxie partielle) ne donne pas de meilleurs résultats que ceux obtenus sur pollen sec (à l'ouverture du flacon). La réhydratation du pollen (organe de dissémination en vie ralentie) permet une reprise du métabolisme au cours de laquelle les échanges gazeux (respiration) doivent jouer un rôle important.

L'influence très marquée du pH sur la germination du pollen stocké est un résultat tout à fait original dans la mesure où le pollen d'un grand nombre de plantes ne semble pas avoir d'exigence particulière (Johri et Vasil, 1961) et où le pH des milieux est souvent négligé. Sur cocotier le pH pourrait, comme le souligne Heller (1982), influencer les échanges cellulaires et la croissance des tubes polliniques.

Sur pollen de cocotier réhydraté, l'effet bénéfique du bore, souvent présent en abondance dans les sécrétions stigmatiques (Gaugh et Ouggar, 1953) pourrait être lié à son action stimulatrice sur le métabolisme des sucres (Johri et Vasil, 1961). D'après Stanley et Loewus (1964) il intervient dans la synthèse des pectines nécessaires à l'élaboration des tubes polliniques.

L'action stimulatrice de l'ion calcium peut être due à son intervention dans l'élaboration de la paroi des tubes polliniques où il joue le rôle de ciment entre les différents éléments constitutifs (Brewbaker et Kwack, 1963).

Peu de données sont actuellement disponibles sur le mode d'intervention de l'ion magnésium dans la germination des pollens. Ce cation pourrait agir en synergie avec l'ion calcium comme le suggère Duhoux (1972).

Il faut enfin souligner l'influence non significative de l'ensemble des quatre sels minéraux sur la germination du pollen de cocotier non réhydraté (Figs. 4 à 7). L'effet stimulateur de l'acide borique, du nitrate de calcium et du sulfate de magnésium n'est pas perceptible sur le pollen déshydraté. Il en est de même pour l'effet inhibiteur du calcium et du magnésium aux fortes concentrations.

Ces faits expérimentaux sont à rapprocher de l'idée selon laquelle la déshydratation du pollen constituerait un traitement protecteur contre une germination prématurée.

D'un point de vue pratique, l'ensemble des données nouvellement acquises permet de définir un milieu de germination du pollen de cocotier dont la composition est la suivante :

Solution minérale :

$[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4 \text{H}_2\text{O}] = 300 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

$[\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}] = 200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

$[\text{H}_3\text{BO}_3] = 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

$[\text{KNO}_3] = 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Source carbonée : (glucose) = $120 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

pH ajusté à 5,5 avant utilisation.

L'utilisation de ce milieu sous forme liquide rend plus aisé le contrôle de son pH, facteur primordial pour la germination du pollen de cocotier.

Nous mentionnons enfin, la possibilité dans la pratique de planifier la lecture des tests de germination en conservant au froid (+ 4 °C) les boîtes de pétri contenant les grains de pollen germés. A cette température, la germination du pollen de cocotier est totalement inhibée et l'intégrité des tubes polliniques se trouve conservée.

Remerciements. — Nous remercions M. Benard de la Division cocotier IRHO pour ses précieux conseils et l'intérêt qu'il a porté à notre étude, ainsi que M. Page pour son assistance technique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALDABA V. C. (1921) — The Pollination of Coconut *Philippe Agriculturist*, **10**, 195-210
- [2] BUFFARD-MOREL J., VAN den DRIESSCHE R. et VAZART B. (1963) — Etude de l'influence du Bore sur la germination *in vitro* du pollen de palmer à huile. *Oléagineux*, **1**, 35-42
- [3] BREWBAKER J. L. and KWACK B. H. (1963) — The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth *Amer. J. of Botany*, **50**, 858-865
- [4] DEXHEIMER J. (1970) — Recherches cytophysiologiques sur les grains de pollen. *Rev. Cytol. et Biol. Vég.*, **33**, 169-234
- [5] DUHOUX E. (1972) — Formation de la paroi du grain de pollen de *Juniperus communis* L. cultivé *in vitro*, au cours de la phase d'hydratation. *C.R. Acad. S.C. Paris*, **274**, 2767-2770
- [6] GAUCH H. G. and OUGGAR W. M. (1953) — The role of boron in the translation of sucrose *Plant Physiol.*, **28**, 457-466
- [7] HELLER R. (1982) — Croissance de la paroi. In *Physiologie Végétale*, Tome 2, 5-9, Ed. Heller Masson Paris.
- [8] JOHRI B. M. and VASIL I. K. (1961). — Physiology of pollen *The Botanical Review*, **27**, 325-381
- [9] LABARCA C. and LOEWUS F. A. (1972) — The nutritional role of pistil exudate in pollen tube wall Formation in *Lilium longiflorum* L. Utilization of injected stigmatic exudate *Plant Physiol.*, **50**, 7-14.
- [10] OBERLE G. D. and WATSON R. (1953). — The use of 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride in viability tests of fruit pollens. *Amer. Soc. Hort. Sci. Proc.*, **61**, 299-303.
- [11] PATEL J. S. (1938) — *The Coconut a Monograph* Govt Press, Madras
- [12] ROGNON F. et de NUCE de LAMOTHE M. (1978) — Récolte et conditionnement du pollen pour la pollinisation des champs semenciers de cocotiers *Oléagineux*, (1), **33**, 17-23
- [13] STANLEY R. G. et LOEWUS F. A. (1964). — Boron and myo-inositol in pollen pectin biosynthesis. In pollen physical and fertilisation. Symp. Ed. Linskens, North Holland, Pub. comp. Amsterdam, (107-119).



Optimisation of *in vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) pollen germination conditions in order to develop a viability test

J. L. VERDEIL (1) and C. PANNETIER (2)

INTRODUCTION

Directed pollination, used for hybrid coconut seed production, calls for large quantities of high-quality pollen

The coconut pollen harvesting and storage technique developed by Rognon and de Nuce de Lamothe (1978) enables it to be stored, transported and preserved for planned usage depending on requirements. It should be possible to check pollen viability, estimated in terms of its *in vitro* germination percentage, throughout the process, so as to detect any incidents and guarantee final product quality.

(1) IRHO-CIRAD, Laboratoire de culture *in vitro* de l'ORSTOM, 2051, avenue du Val-de-Montferand, B.P. 5045, 34032 Montpellier Cedex

(2) IRHO-CIRAD, Laboratoire de biologie cellulaire, INRA Centre de Versailles, 78026 Versailles Cedex

There is little data available on the composition of germination media suitable for coconut pollen. Aldaba (1921) recommends a solution of 250-300 g/l of sucrose and 20 g/l of gelatine. According to Patel (1938), germination is better on a medium containing 50 g/l

of sugar and 20 g/l of gelatine. In addition, at the various stations with which we work, the results obtained on an agar-sucrose medium (12 g/l-120 g/l) vary widely, depending on the brand and sometimes the batch of agar used.

In view of these varying data, trials were conducted to identify the factors involved in coconut pollen germination. The study concentrated on pollen water content, glucose concentration, mineral composition of the medium and its pH.

As regards mineral composition, various mineral salts which were known to stimulate germination were tested: boric acid (Gauch and Ouggar, 1953), calcium nitrate (Brewbaker and Kwack 1963), potassium nitrate and magnesium sulphate (Dexheimer, 1970).

Since the aim of the study was limited to estimating coconut pollen viability by measuring its germination capacity on a simple medium, the effect of compound substances, such as amino acids, vitamins and phytohormones, was not tested.

MATERIAL AND METHODS

a — Planting material.

The pollen was harvested at the Pobé Station (Benin) from hybrid trees Malayan Yellow Dwarf × West African Tall (PB121 hybrid developed by IRHO).

It was dehydrated and vacuum packed following the technique described by Rognon and de Nucé de Lamothe (1978).

b — Trial procedure.

— Mineral solution.

For each mineral salt tested (H_3BO_3 ; $Ca(NO_3)_2$; KNO_3 ; $MgSO_4$), preliminary trials based on the main bibliographical data led to identification of a basic concentration enabling satisfactory coconut pollen germination:

Basic mineral medium:

$[H_3BO_3] = 100 \text{ mg/l}$; $[Ca(NO_3)_2, 4 H_2O] = 300 \text{ mg/l}$,
 $[KNO_3] = 100 \text{ mg/l}$, $[MgSO_4, 7 H_2O] = 200 \text{ mg/l}$.

We varied the concentration of each mineral salt, taken separately, according to a scale, keeping the concentrations of the other three salts constant (basic mineral medium concentration).

— Effect of water content, pH and glucose concentration.

The effect of pollen grain water content, pH and glucose concentration were studied, using the basic mineral medium.

Each trial was replicated at least twice, on two different pollen batches.

c — Measurements.

— Measuring pollen water content.

Pollen water content was determined when the sealed bottles were opened. It was also calculated after pollen rehydration, which was carried out at maximum relative humidity and over various lengths of time.

The dry weight of a given quantity of pollen was measured after desiccation for 48 hours in a drying oven set at 110 °C.

— Determining germination percentages.

● Pollen seeding 20 mg of pollen (quantity measured when bottles were opened) were seeded in a 60 mm diameter disposable petri dish containing 20 ml of liquid culture medium.

So as to limit the density effect, the trials were conducted in a liquid medium (more uniform pollen distribution than on agar-agar). Pollen density (1 mg/ml of medium) was the same for each trial.

The dishes were placed in a drying oven at $28 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$, for 2 hours.

Counting germinated pollen grains: the germination percentage was calculated after two hours' culturing.

600 grains per dish were counted directly on the dishes, using an inversion microscope. Germinated pollen grains were counted using a mechanical digital counter.

4 dishes were seeded for each batch and each different medium. An overall mean for the 4 values was calculated.

RESULTS

a — Effect of pollen water content.

● Rehydration kinetics.

Changes in pollen water content according to the length of the rehydration period at maximum relative humidity are shown in

figure 1 (means and standard deviations calculated over 12 pollen batches)

Rehydration kinetics show a very rapid change in water content over the first 4 hours (a 7.8 % increase between t0 and t0 + 4 hrs). Rehydration was much slower from hour 4 onwards (an increase of 7.42 % between hour 4 and hour 20).

● Changes in the germination percentage.

Since pretreatment at maximum relative humidity enables pollen rehydration, it facilitates germination. A rehydration period of 2 to 6 hours (water content of 8 to 13 %) improved the germination rate compared with that obtained on dry pollen (at 4 % humidity), the germination rate was 3.5 times higher than for dry pollen (see Fig. 1)

Pollen rehydrated for 20 hours at maximum relative humidity (mean water content of 19 %) germinated less well than pollen hydrated for 6 hours (13 % water): germination rate 21.5 % as opposed to 49 %

An estimate of pollen viability, using the tetrazolium chloride colorimetric test (Oberle and Watson, 1953), gave a mortality rate of 46.8 % after 20 hours' hydration at maximum relative humidity. The rate was only 24.5 % on pollen rehydrated for 6 hours (mortality rate not significantly different from that for dry pollen).

b — Effect of glucose concentration.

The effect of glucose concentration on coconut pollen germination was tested after 2 hours' rehydration at maximum relative humidity.

The results obtained are given in figure 2. The graph shows that the optimum glucose concentration is 120 g/l.

Below 60 g/l, the germination medium is hypotonic and water seeps into the grains. Most of them are hypertrophied and subsequently burst.

Pollen tube growth in those grains that succeed in germinating at high glucose concentrations (140, 160 and 200 g/l) is much lower than at 120 g/l. At these concentrations, most of the germinated pollen grains are plasmolyzed.

At 340 g/l, the osmotic pressure of the medium is such that the grains absorb no, or practically no, water (they are the shape of a coffee grain, and reminiscent of dehydrated pollen grains).

Hence glucose concentration not only affects the germination percentage, but also the morphology and growth of coconut pollen tubes, since sugars play a role in osmotic pressure and as a carbonated substrate, used in parietal compound synthesis reactions (Labarca and Loewus, 1972).

c — Effect of germination medium pH.

The graph in figure 3 shows the very marked effect of pH on coconut pollen germination.

Germination is optimum at pH 5.5. This optimum value trends a very fine line: when pH increases one unit (pH = 6.5), the germination rate drops from 48.2 to 25 %. For a pH of 4.5, the germination rate is only 32.3 %

Since the medium used is not buffered, its pH can change during autoclaving and storage. Coconut pollen germination is very sensitive to variations in pH, and it is therefore essential to check the pH just before seeding (adjusting pH to 5.5).

Coconut pollen sensitivity as regards pH could explain the different results obtained with the various brands of agar-agar used (the pH of a gel medium can vary more than a unit, depending on the degree of purity of the agar used)

d — Effect of the mineral solution.

The effect of each mineral salt on the germination percentage, depending on its concentration in the medium, is shown in figures 4, 5, 6 and 7.

Three of the four mineral salts tested had a marked influence on germination rate: calcium nitrate, magnesium sulphate and boric acid.

For each of these 3 salts, there is an optimum concentration:

$[Ca(NO_3)_2, 4 H_2O] = 300 \text{ mg/l}$; $[MgSO_4, 7H_2O] = 200 \text{ mg/l}$;
 $[H_3BO_3] = 100 \text{ mg/l}$.

At high concentrations (over 300 and 400 mg/l respectively), magnesium sulphate and calcium nitrate inhibit pollen tube growth.

In contrast, boric acid stimulates pollen tube growth at concentrations of more than 200 mg/l, making counting more difficult (tangled pollen tubes). A boric acid concentration of 100 mg/l, which stimulates germination whilst enabling easy counting, should be used.

At concentrations of 0 to 400 mg/l and under the conditions in which it was tested, potassium nitrate had no significant effect on hydrated coconut pollen germination. Removing it could lead to a simplification of the mineral solution, but it would be necessary to test its possible interactions with calcium and magnesium ions beforehand (the stimulant effect of these two cations was detected in the presence of KNO_3 at 200 mg/l).

DISCUSSION AND CONCLUSION

The trials conducted mean that the factors involved in coconut pollen germination can be better identified :

- the need for rehydration at maximum relative humidity as soon as the pollen bottles are opened ;
- high sensitivity to the pH of the germination medium (optimum pH : 5.5) ;
- the importance of the osmotic pressure in the medium (optimum glucose concentration from 100 to 120 g/l inclusive) ,
- the stimulant effect of two cations, Ca^{++} and Mg^{++} , supplied in the form of calcium nitrate and magnesium sulphate ;
- the beneficial effect of boric acid.

Prior pollen rehydration to stimulate germination should be compared with the observations made on oil palm by Buffard-Morel *et al.* (1964), stressing the beneficial effect of opening the sealed bottles a few hours before seeding.

This result could apparently be extended to cover all stored pollens which are artificially dehydrated in order to facilitate storage (Johri and Vasil, 1961, overview) (coconut pollen keeps well in a vacuum as long as its water content does not exceed 6 %).

It should be noted that pollen rehydration is only effective as regards germination if it is conducted in a gaseous atmosphere. Pollen rehydrated by immersion in water or a liquid germination medium (partial anoxia) does not give any better results than those obtained using dry pollen (when the bottle is opened). Rehydrating pollen (dissemination organ with a low rate of metabolic activity) makes it possible to re-start the metabolism, in which gas exchanges (respiration) play an important role.

The very marked effect of pH on the germination of stored pollen is an entirely original result, insofar as taking pollen from a large number of plants does not seem to impose any particular constraints (John and Vasil, 1961) and media pH is often glossed over. As

Heller (1982) mentions, pH could affect cellular exchange and pollen tube growth in coconut.

The positive effect on rehydrated coconut pollen of boron, which often abounds in stigmatal secretions (Gaugh and Ouggar, 1953), could be linked to its stimulant action on sugar metabolism (Johri and Vasil, 1961). According to Stanley and Loewus (1964), it plays a role in the synthesis of pectins necessary for building pollen tubes.

The stimulant effect of the calcium ion could be due to its role in pollen tube wall construction, where it acts as a bond between the various component parts (Brewbaker and Kwack, 1963).

Few data are currently available on the role played by the magnesium ion in pollen germination. This cation could act in synergy with the calcium ion, as suggested by Duhoux (1972).

Lastly, it should be stressed that the four mineral salts tested do not have a significant effect on non-rehydrated coconut pollen germination (Figs. 4 to 7). The stimulant effect of boric acid, calcium nitrate and magnesium sulphate is not noticeable on dehydrated pollen. The same goes for the inhibitive effect of calcium and magnesium at high concentrations.

These experimental facts should be compared with the hypothesis that pollen dehydration is a protective treatment to guard against premature germination.

From a practical point of view, the newly acquired data make it possible to identify a coconut pollen germination medium, composed as follows :

Mineral solution :

$[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4 \text{H}_2\text{O}] = 300 \text{ mg/l}$

$[\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}] = 200 \text{ mg/l}$

$[\text{H}_3\text{BO}_3] = 100 \text{ mg/l}$

$[\text{KNO}_3] = 100 \text{ mg/l}$.

Carbon source : [glucose] = 120 mg/l.

pH adjusted to 5.5 before use.

Using the medium in liquid form makes it easier to check pH, a factor which has proved to be of prime importance in coconut pollen germination.

Lastly, we should like to mention that in practice, the interpretation of germination tests can be spread over time, by keeping the petri dishes containing germinated pollen grains in cold storage (+ 4 °C). At this temperature, coconut pollen germination is totally inhibited, but the pollen tubes remain intact.

Acknowledgements. — We should like to thank Mr. Benard, at the IRHO coconut Division, for his invaluable advice and the interest he showed in our study, and Mr. Page, for his technical assistance.

SUMMARY

Optimisation of *in vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) pollen germination conditions in order to develop a viability test.

J. L. VERDEIL and C. PANNETIER, *Oléagineux*, 1990, 45, N° 4, p. 175-181.

This study aims to identify the factors involved in *in vitro* coconut pollen germination. It concentrates essentially on pollen grain water content and the mineral composition, glucose concentration and pH of the medium. It reveals the high sensitivity of coconut pollen to germination medium pH (optimum pH 5.5), the importance of osmotic pressure in the medium (optimum glucose concentration around $110 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), the stimulant effect of two cations : the Ca^{++} ion and the Mg^{++} ion and the effect of pollen grain water content on germination. From a practical point of view, the data obtained make it possible to define a germination medium adapted to coconut pollen. Its composition and pollen grain seeding method are described.

RESUMEN

Optimización de las condiciones de germinación *in vitro* del polen de cocotero (*Cocos nucifera* L.) para desarrollar una prueba de viabilidad.

J. L. VERDEIL y C. PANNETIER, *Oléagineux*, 1990, 45, N° 4, p. 175-181

Este estudio, tiene por objeto aclarar los factores de la germinación *in vitro* del polen de cocotero. Se trata principalmente del contenido de agua de los granos de polen, la composición mineral del medio, su concentración de glucosa y su pH. Evidencia la gran sensibilidad del polen de cocotero con relación al pH del medio de germinación (siendo de 5,5 el pH óptimo), la importancia de la presión osmótica del medio (siendo de casi $110 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ la concentración óptima de glucosa), la influencia estimuladora de dos cationes : el ion Ca^{++} y el ion Mg^{++} , y la influencia del grado de hidratación del polen en su germinación. Concretamente, el conjunto de los datos reunidos permite definir un medio de germinación adecuado al polen del cocotero. Se indica la composición y la forma de sembrar los granos de polen.