

50376
1962
54

50376
1962
54

- UNIVERSITE DE LILLE -

FACULTE DES SCIENCES.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES DE SCIENCES NATURELLES.

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA GERMINATION IN VITRO

DU POLLEN DE PRIMULA OBCONICA.



Soutenu à Lille en Juin 1962
par TERNYNCK Claude.

INTRODUCTION.

Primula obconica que nous utilisons comme matériel expérimental pour l'étude des conditions de germination de pollen in vitro, est, comme toutes les primevères, hétérostyle; l'espèce comporte deux types de plantes - longistyle et brévistyle -, à fleurs différant par la position respective du stigmate et des anthères.

Les fleurs brévistyles possèdent un style court, caché dans le fond de la corolle et des anthères bien visibles, situées au sommet du tube de la corolle; les longistyles possèdent un long style surmonté d'un stigmate bien visible, les anthères sont cachées dans le fond de la corolle.

Une brève étude microscopique nous montre d'autres différences :

- Les fleurs longistyles ont des papilles stigmatiques qui mesurent environ 22μ de long, leur pollen un diamètre moyen de 16μ et les tubes polliniques, une épaisseur de $4,9 \mu$.
- Les fleurs brévistyles ont des papilles stigmatiques de 11μ , le pollen a un diamètre moyen de 22μ , les tubes polliniques, une épaisseur de $7,3 \mu$.

Nous essayons d'abord de voir si, à ces différences morphologiques, correspond une différence dans la croissance des tubes polliniques.

Puis, des essais de germination de pollen sont faits sur différents milieux afin de mettre en évidence l'action stimulante ou inhibitrice des diverses substances additionnées et éventuellement déterminer le milieu le plus favorable à la croissance des tubes polliniques in vitro.

Les courbes de croissance établies ci-dessous ne sont valables que dans les conditions d'expérience que nous indiquons.

I - MATERIEL & METHODE.

Les plantes utilisées proviennent du Jardin Botanique de Lille; elles sont maintenues en serre à 20°C environ. La méthode de travail ne s'acquiert qu'après maints essais de germination infructueux. (Grains de pollen non germés ou éclatés.)

Nous essayons de dégager de ces mauvaises germinations les causes mêmes de ces défections. Il semble qu'elles soient diverses :

- La cause première est le prélèvement trop tardif du pollenensemencé. Les anthères doivent être prélevées au moment de l'anthèse, ou mieux, très peu de temps avant. Plus le temps séparant anthèse et ensemencement est long, plus les chances de germination sont réduites.

Exemple :

- Pour le pollen prélevé au moment de l'anthèse, les

comptages donnent un pourcentage optimum de 95% de grains germés.

- Pour le pollen pris au moment de l'anthèse, mais gardé 12 heures en boîte de Pétri, dans une atmosphère saturée d'humidité, les comptages donnent 50% de grains germés, les autres grains gonflés ne germent pas ou éclatent.

- Si le pollen est prélevé 24 heures après l'anthèse et ensemencé immédiatement, seuls quelques grains germent convenablement, les autres ne gonflent pas.

Ceci fait supposer que ce pollen a une durée de vie très courte. Le pollen frais est jaunâtre, il perd ses pigments en vieillissant.

Il faut saisir une anthère à l'aide de pinces fines et frapper légèrement près de l'extrémité, pour éparpiller le pollen sur le milieu nutritif. Il est recommandé de souffler légèrement pour obtenir un meilleur étalement du pollen.

La composition du milieu nutritif est la suivante :

- 100 cc d'eau distillée;
- 1,5g de gélose en paillettes de préférence;
- 1g de gélatine;
- 10g de glucose pur.

L'agar-agar ne doit pas être bouilli.

Gélose, gélatine et sucre sont trempés dans l'eau durant quelques heures puis dissous à 60-70°C.

La meilleure concentration en glucose, gélose et gélatine est recherchée. Celle signalée ci-dessus fournit les tubes les plus longs après 6 heures et les meilleurs pourcentages de germination.

L'ensemencement, sur agar-agar ou gélatine seul donne des résultats inférieurs quant à la longueur des tubes polliniques, ce qui nous conduit à mélanger les deux substances dans les proportions 3/2.

Le tableau suivant nous permet de déduire la concentration optimum en glucose :

: glucose	:	longueur des tubes:	longueur des tubes	:
:	%	de Brévistyles	de Longistyles (en μ):	:
:	:	(en μ)	:	:
:	:	6h de germination	6h de germination	:
:	5	:	144	:
:	:	:	:	:
:	8	:	223	:
:	:	:	:	:
:	10	:	230	:
:	:	:	:	:
:	12	:	222	:
:	:	:	:	:
:	15	:	95	:
:	:	:	:	:
:	20	:	60	:
:	:	:	:	:

Ces chiffres sont les moyennes des 20 tubes polliniques les plus longs. Pour ces essais, nous prenons le pollen de diverses fleurs.

Le milieu nutritif est bien étalé sur des lames placées ensuite dans une atmosphère humide. Celle-ci est obtenue en disposant un carré de papier-filtre épais et mouillé entre la cuve à lames et le couvercle. Les cuves sont mises en étuve à 25°C.

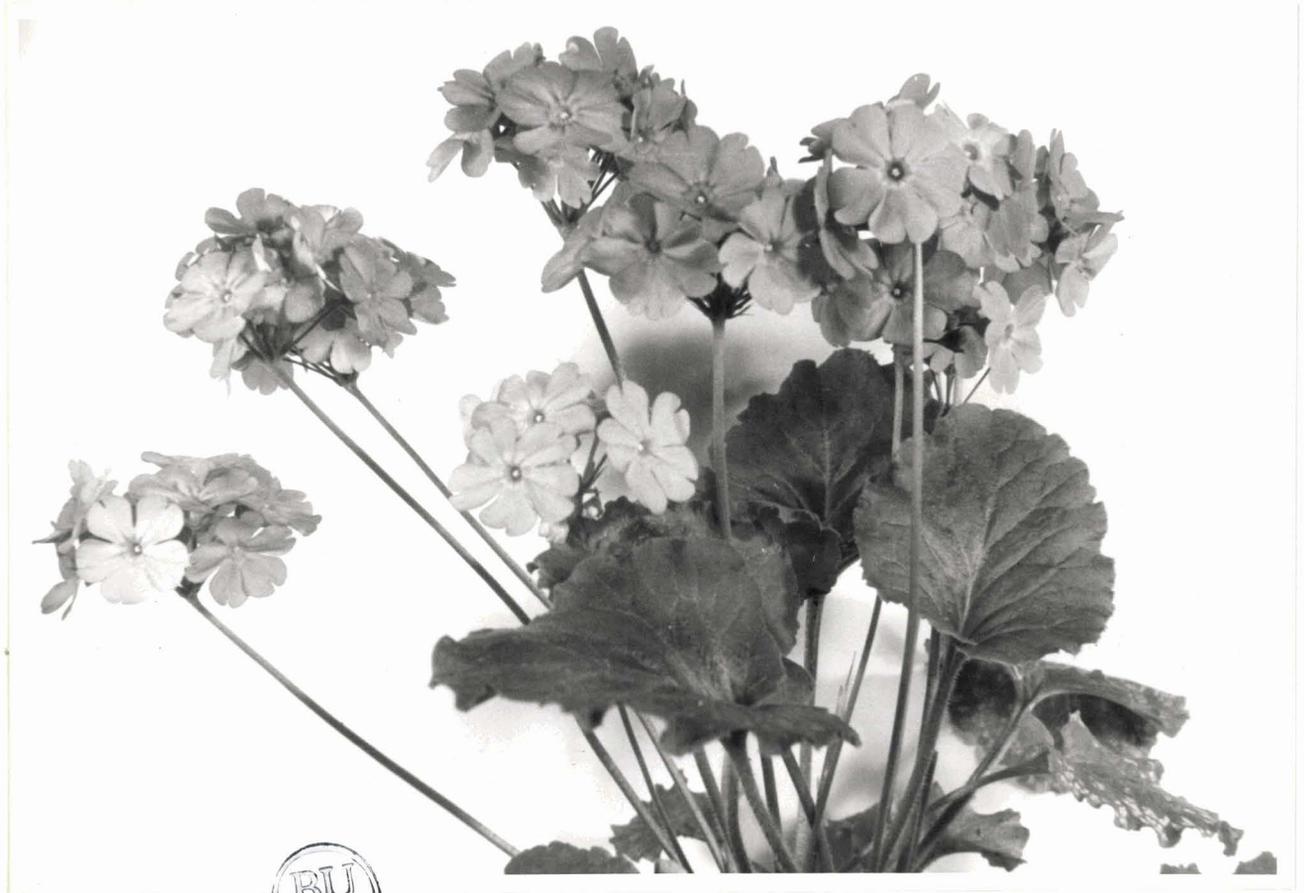
En faisant varier l'épaisseur du milieu nutritif, la quantité d'eau déposée dans le fond des cuves et l'épaisseur du papier-filtre, des différences importantes apparaissent dans les germinations.

De façon générale, les meilleures germinations ont lieu sur couches de milieu de 20 μ (mesurée grâce à la vis micrométrique).

D'autre part, quand le fond des cuves est recouvert d'eau, des gouttelettes se forment rapidement sur le milieu et font éclater les grains. Si les cuves ne contiennent pas d'eau, le milieu se dessèche rapidement. Deux ou trois gouttes d'eau suffisent pour avoir une bonne germination.

Dans l'étude de la croissance, nous ne gardons souvent que les quatre lames présentant les meilleurs pourcentages de germination et les tubes polliniques les plus longs.

Primula obconica.



fleurs brévistyles.



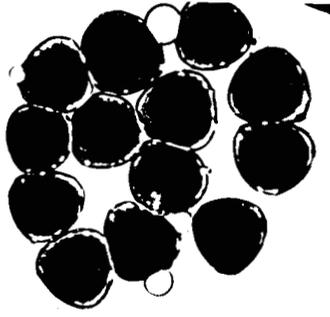
fleurs longistyles.



Primula obconica

Pollen de longistyles

Pollen de brévistyles



15

Papilles stigmatiques de *Primula obconica*

Fleurs longistyles

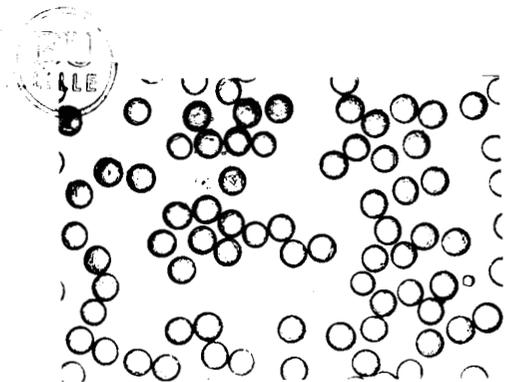
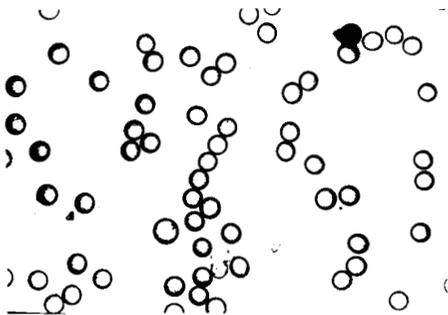
Fleurs brévistyles



Primula officinalis

Pollen de longistyles

Pollen de brévistyles



15

Tubes polliniques
de longistyles.
Gt. 550

Tubes polliniques
de brévistyles.
Gt. 550



Eclatement d'un tube pollinique de longistyle.



II - ETUDE COMPARATIVE DE LA CROISSANCE DES TUBES POLLINIQUES DE FLEURS LONGISTYLE ET BREVISTYLE.

Le mode opératoire est indiqué ci-dessus.

La croissance des tubes polliniques est arrêtée après 4h30, 6h, 8h, 10h, 12h, 14h, 16h, 20h de germination en déposant une goutte de formol sur le papier-filtre.

La longueur des tubes est exprimée en divisions de l'oculaire micrométrique.

- pour grossissement 8 X 10, 1 division = 3,7 μ
" " 8 X 40, 1 " = 14,7 μ

Les chiffres sont volontairement placés, pour chaque essai, dans un ordre croissant, afin de faciliter les comparaisons.

Le résultat de chaque essai est donné par la moyenne \pm l'écart-type. ($M \pm \sigma$)

Arrêt de la croissance des tubes polliniques après 4h30
de germination.

- Fleurs longistyles.

I° essai : 25 mesures :	Moyenne
9-10-11-13-15-15-15-16-16-16-17-17 17-19-19-19-20-20-20-21-21-22-25-25- 28	17,8 d ou 65,8 μ
2° essai : 25 mesures : 12-15-16-17-20-20-20-20-21-22-22- 22-22-22-25-25-25-25-25-25-26-29- 32-35-35-	23,1 d ou 85,4 μ
3° essai : 25 mesures : 13-14-15-15-17-18-20-20-21-21-21- 22-23-23-24-25-25-25-25-26-27-28- 30-33-39.	22,4 d. ou 82,8 μ
4° essai : 25 mesures : 12-13-15-15-17-17-17-17-18-18- 20-21-22-22-25-26-27-27-28-29-32- 33-35-46.	22,7 d ou 83,9 μ
Moyenne générale :	<u>21,5 d ou 79,4μ ± 24</u>

- Fleurs brévistyles :

1) essai : 25 mesures : 20-22-22-23-23-25-30-30-30-31-31- 32-32-32-34-34-34-34-35-36-38-43- 43-43-44-	32 d ou 118,4 μ
2° essai : 25 mesures : 14-20-21-22-24-26-30-30-32-34-36- 36-36-36-37-38-38-40-41-44-45-45- 50-55-60	35,6 d ou 131,7 μ
3° essai : 25 mesures : 30-30-30-30-32-32-35-35-35-37-40- 40-40-42-43-43-43-45-45-45-45-46- 53-55-60	40,4 d ou 150,6 μ
4° essai : 25 mesures : 25-30-30-34-36-38-38-38-40-40-40- 42-42-44-45-45-45-46-47-48-52-53- 60-60-65	43,2 d ou 159,8 μ
Moyenne générale :	<u>37,8 d ou 139,8μ ± 36,2</u>

Arrêt de la croissance des tubes polliniques après 6 heures de germination.

- Fleurs longistyles.

1° essai : 20 mesures :	moyenne
22-22-22-25-25-25-25-30-30-30-30-30-32-35-38-40-40-50-60-60.	33,5 d ou 124,9 μ
2° essai : 30 mesures :	
18-25-25-25-30-30-30-30-30-30-30-35-35-35-37-38-40-40-40-40-45-45-45-46-50-55-62-65-75-85-	39,8 d ou 147,2 μ
3° essai : 50 mesures :	
22-22-23-25-25-27-26-28-30-30-30-30-31-32-32-32-32-32-34-34-34-34-35-35-36-36-37-37-37-37-38-38-38-38-38-39-39-41-41-41-42-42-43-43-44-45-47-50-50-50.	35,6 d ou 132 μ
4° essai : 50 mesures :	
32-35-35-35-35-35-35-36-37-37-37-38-40-40-40-40-40-40-40-40-40-40-40-40-42-42-42-42-42-42-42-42-43-44-44-44-45-45-45-45-47-48-48-50-50-50-50-50-52-55-55-65-	42,7 d ou 158 μ
Moyenne générale : 38,4 d ou 142 μ \pm 40,7	

- Fleurs Brévistyles.

1° essai : 20 mesures :	
43-50-50-60-60-60-65-65-70-70-70-70-72-75-75-80-82-85-85-95	69,1 d ou 255,6 μ
2° essai : 30 mesures :	
36-36-41-42-45-46-46-48-50-50-51-60-60-60-60-63-65-65-66-67-68-68-71-72-75-75-76-76-78-80	59,8 d ou 221,2 μ
3° essai : 50 mesures :	
40-45-45-46-47-50-50-50-50-50-51-51-52-55-55-55-55-55-55-55-57-60-60-60-60-60-60-60-62-62-65-65-66-70-70-72-72-74-75-75-77-78-78-80-80-80-80-87	61,4 d ou 227,3 μ
4° essai : 50 mesures :	
62-65-70-72-72-74-75-75-76-76-78-80-80-80-80-80-80-82-82-83-83-85-85-85-86-90-90-90-90-90-90-90-92-92-94-95-95-95-95-95-95-95-96-100-100-105-105-108-115-135	87,6 d ou 324,3 μ
Moyenne générale : 71 d ou 262 μ \pm 64,3	

Arrêt de la croissance des tubes polliniques après 8heures de germination.

- Fleurs longistyles.

Moyenne

1° essai : 40 mesures

27-30-30-32-33-33-35-35-35-38-40-
40-40-43-43-43-44-45-45-45-45-48-
48-50-53-55-55-55-60-60-65-76-77-
80-85-90-90-105-110-110

54,3 d ou 210,9 μ

2° essai : 60 mesures :

39-40-40-42-43-43-44-45-45-45-46-
47-48-48-48-49-50-50-51-52-53-55-
55-55-55-55-55-58-60-60-60-60-60-
64-64-65-65-66-68-72-75-80-90-90-
95-105-105-105-110-110-110-120-120
125-140-140-140-145-150-155

73,6 d ou 272,3 μ

3° essai : 20 mesures :

40-41-42-43-46-46-47-48-50-50-50-
50-50-50-50-52-53-55-55-55;

48,6 d ou 179,8 μ

Moyenne générale : 59 d ou 218,3 μ \pm 107,3

- Fleurs brévistyles :

1° essai : 40 mesures :

45-47-50-50-55-57-60-60-60-60-
60-60-65-65-65-65-70-70-70-71-72-
72-75-75-75-80-80-85-85-85-85-
90-95-95-97-100-100-120

73 d ou 270,1 μ

2° essai : 60 mesures :

88-90-90-90-90-94-95-95-95-96-98-
100-100-100-100-100-103-105-105-
105-105-110-110-110-110-112-112-
112-115-115-115-115-115-115-120-
120-120-120-120-120-120-120-122-
123-123-123-124-125-125-125-125-
130-130-130-132-132-135-145-145-
155

113,6 d ou 420,3 μ

Moyenne générale : 97 d ou 358,9 μ \pm 92,5

Arrêt de la croissance des tubes polliniques après 10 heures de germination.

- Fleurs longistyles

Moyenne

1° essai : 25 mesures : 52-62-67-68-70-70-70-71-78-79-81- 83-85-85-85-90-92-95-95-100-100- 102-105-110-115.	84,4 d ou 313,2 μ
2° essai : 25 mesures : 61-62-62-69-70-71-72-72-72-75- 78-80-80-81-82-85-86-90-95-96-98- 100-102-105.	79 d ou 292,3 μ
3° essai : 25 mesures : 67-67-70-70-74-78-80-80-80-83-85- 85-87-89-90-91-95-95-96-100-100- 102-105-110-110.	87,4 d ou 323,3 μ
4° essai : 25 mesures : 59-60-63-65-65-68-70-71-72-74-75- 76-76-77-79-80-80-80-82-82-82-86- 87-89-105.	76 d ou 281 μ
Moyenne générale :	<u>81,7 d ou 302,3μ \pm 50,3</u>

- Fleurs brévistyles

1° essai : 25 mesures : 85-92-95-95-100-105-105-105-105- 110-115-115-115-115-120-120-120- 120-130-130-130-140-140-140-170-	116,6 d ou 431,4 μ
2° essai : 25 mesures : 115-125-125-132-135-140-140-140- 140-140-142-145-145-145-145-145- 148-150-150-152-155-160-160-165- 185	145 d ou 536,5 μ
3° essai : 25 mesures : 90-90-100-105-105-110-115-120-125 125-130-135-137-140-144-144-145- 145-147-150-150-152-159-170-220	134 d ou 505,8 μ
4° essai : 25 mesures : 68-80-80-83-85-85-85-88-90-90-90- 96-98-99-102-102-103-105-105-111- 120-127-128-130-138.	99,5 d ou 368,1 μ
Moyenne générale :	<u>123,7 d ou 457,6μ \pm 98,4</u>

Arrêt de la croissance des tubes polliniques après
12 heures de germination.

- Fleurs longistyles

Moyenne

1° essai : 25 mesures :	
80-88-90-90-91-98-105-105-105-105- 110-115-116-120-120-125-125-125- 130-130-135-138-140-150.90	113 d ou 418,1 μ
2° essai : 25 mesures :	
82-90-95-95-98-102-105-105-110-110- 110-110-110-112-112-112-117-120-120- 125-125-140-142-145-180	114,8 d ou 424,7 μ
3° essai : 25 mesures :	
85-89-90-91-93-93-95-97-98-100-101- 102-105-106-108-108-109-113-115-115 116-120-120-123-132.	104,9 d ou 388,1 μ
4° essai : 25 mesures :	
85-87-90-90-95-95-102-102-103-104- 105-105-106-107-107-108-109-115- 125-128-130-132-135-145-155	110,6 d ou 409,2 μ
Moyenne générale :	<u>110,8 d ou 409,9μ \pm 65,4</u>

- Fleurs brévistyles

1° essai : 25 mesures :	
100-120-120-120-125-125-132-135-135 138-140-145-145-145-145-148-150-150 155-165-170-180-180-180-185-	145,3 d ou 537,6 μ
2° essai : 25 mesures :	
96-110-115-115-125-125-125-130-130 133-137-140-145-145-145-150-155-155- 165-165-170-172-180-185-195.	144,3 d ou 533,9 μ
3° essai : 25 mesures :	
98-110-120-125-130-135-140-140-145- 148-150-150-150-152-155-155-155-160- 165-170-170-175-180-180-190-	149,9 d ou 554,6 μ
4° essai : 25 mesures :	
90-100-105-110-110-115-115-120-120- 120-125-125-125-125-130-130-135-135- 140-145-150-155-175-188-145	129,3 d ou 478,4 μ
Moyenne générale :	<u>142,2 d ou 526,1μ \pm 87,6</u>

Arrêt de la croissance des tubes polliniques après
14 heures de germination.

- Fleurs longistyles

Moyenne

- 1° essai : 25 mesures :
I22-I30-I30-I35-I35-I40-I50-I50-I50-
I50-I58-I60-I60-I60-I60-I65-I70-I70-
I70-I75-I75-I80-I90-215-220- 161,4d ou 597,1 μ
- 2° essai : 25 mesures :
I25-I30-I30-I35-I35-I35-I40-I40-I45-
I45-I50-I60-I60-I60-I70-I70-I75-I80-
I80-I85-I85-I90-I90-200-270- 162,6d ou 601,6 μ
- 3° essai : 25 mesures :
I20-I30-I35-I35-I45-I45-I45-I50-I55
I60-I60-I63-I65-I65-I70-I70-I70-I70
I75-I75-I85-I90-200-205-205- 163,5d ou 604,9 μ
- 4° essai : 25 mesures :
I25-I35-I35-I40-I42-I42-I42-I45-I50
I52-I55-I60-I60-I60-I62-I65-I70-I70
I70 I70 I72 I73 I75 I80 I82 157,2d ou 581,6 μ

Moyenne générale : 161,1d ou 596 μ \pm 87

- Fleurs brévistyles

- 1° essai : 25 mesures :
I05-I25-I25-I25-I30-I35-I35-I35-I40
I42-I55-I55-I58-I60-I65-I65-I70-I72
I72-I75-I75-I75-I85-205-220- 156,1d ou 577,5 μ
- 2° essai : 25 mesures :
85-I00-I05-I10-I10-I15-I15-I15-I15
I20-I25-I25-I25-I30-I30-I30-I42-I60-
I60-I65-I65-I65-I70-I70-I82- 133,3d ou 493,2 μ
- 3° essai : 25 mesures :
72-I28-I30-I36-I40-I40-I45-I47-I55
I60-I65-I65-I67-I70-I75-I80-I80-I85-
205-210-215-220-240-250-300- 179,2d ou 663 μ
- 4° essai : 25 mesures :
97-I10-I15-I40-I40-I45-I50-I60-I65-
I65-I70-I75-I80-I85-I85-I85-I90-200-
200-200-225-230-230-230-280- 178 d ou 558 μ

Moyenne générale : 161,6d ou 597,8 μ \pm 148,3

Arrêt de la croissance des tubes polliniques après
16 heures de germination.

- Fleurs longistyles

Moyenne

1° essai : 25 mesures :

I30-I30-I35-I35-I42-I43-I45-I50-I50-
I55-I62-I65-I65-I65-I65-I70-I70-I70
I75 I80 I80 I85 200 210 235

164,4d ou 608,2 μ

2° essai : 25 mesures :

I30-I35-I50-I50-I60-I65-I65-I70-I72
I75-I75-I75-I76-I80-I80-I80-I85-I85
I95 I97 200 210 215 215 220

178,4d ou 660 μ

3° essai : 25 mesures :

I35-I45-I50-I70-I75-I75-I76-I76-I80
I80-I80-I80-I85-I85-I90-I90-I90-I90
I95-I95-200-210-210-210-220

183,6d ou 679,3 μ

4° essai : 25 mesures :

I30-I30-I35-I40-I40-I45-I50-I60-I70
I70-I75-I75-I80-I83-I94-I97-200-204
207-210-215-220-220-220-225

180,2d ou 666,7 μ

Moyenne générale : 176,5d ou 653,3 μ \pm 96,2

- Fleurs brévistyles

1° essai : 25 mesures :

I20-I26-I40-I45-I45-I50-I60-I60-I60
I70-I72-I84-I90-210-215-230-235-240
250-260-270-285-290-300-330

205,4d ou 759,9 μ

2° essai : 25 mesures :

I50-I60-I75-I80-I90-I90-I90-I95-I95
I98-200-210-210-215-220-222-230-235
235 238 240 260 260 310 350

218 d ou 806,6 μ

3° essai : 25 mesures :

I40-I40-I45-I55-I65-I73-I85-I90-I95
I95-200-200-205-210-210-210-210-215
220-220-220-230-240-260-350

204,9d ou 758,1 μ

4° essai : 25 mesures :

I50-I70-I70-I90-I95-205-215-220-225
235-235-240-240-250-250-270-270-275
275-280-280-300-300-300-310

236,8d ou 876,1 μ

Moyenne générale : 216,2d ou 800,1 μ \pm 183,5

Arrêt de la croissance des tubes polliniques après
20 heures de germination.

- Fleurs longistyles

Moyenne

1° essai : 25 mesures :

105-160-160-160-170-170-175-180-180
185-185-187-190-190-190-200-200-205
210-210-220-220-220-225-225

188,8d ou 698,5 μ

2° essai : 25 mesures :

165-165-170-170-175-175-175-178-180
180-180-180-182-185-190-190-192-195
195-210-210-215-225-230-230

189,6d ou 701,5 μ

3° essai : 25 mesures :

160-170-178-179-180-180-181-182-184
185-185-185-185-195-195-200-203-205
205-205-205-208-210-210-240

194,2d ou 718,5 μ

4° essai : 25 mesures :

135-142-160-175-175-180-180-180-182
184-185-185-185-190-190-195-198-199
200-203-220-225-225-235-265

191,7d ou 709,2 μ

Moyenne générale : 191d ou 706,7 μ \pm 84,7

- Fleurs brévistyles

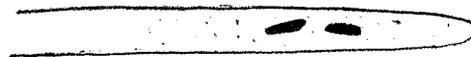
Tous les tubes ont éclaté après 15-16 heures.

Interprétation des résultats :

- La croissance des tubes polliniques de fleurs longistyles est nettement plus lente que celle des tubes polliniques de fleurs brévistyles, jusqu'à la dixième heure de germination.
- Vers la quatorzième heure, les tubes sont d'égale longueur, bien que l'écart-type des longistyles soit plus faible que celui des brévistyles. L'homogénéité de longueur des tubes est donc plus grande chez les longistyles à ce moment.
- A la même heure, on aperçoit à l'extrémité des tubes :
 - chez les longistyles les deux noyaux-gamètes prêts à être libérés;
 - chez les brévistyles le noyau reproducteur qui n'est souvent qu'en prophase; il est d'ailleurs parfois expulsé à ce stade, l'éclatement des tubes se faisant vers la quinzième heure.
- Les tubes polliniques de longistyles n'éclatent qu'après vingt heures de germination, soit environ six heures après l'apparition des noyaux-gamètes.



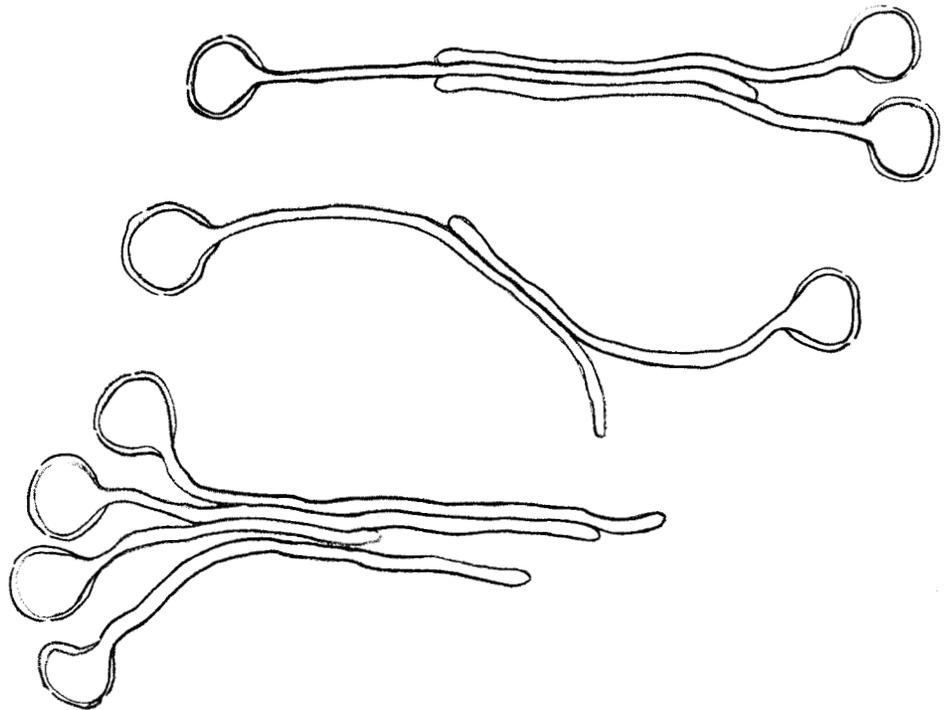
Fin de prophase dans un tube pollinique de brévistyle après 14h de germination.



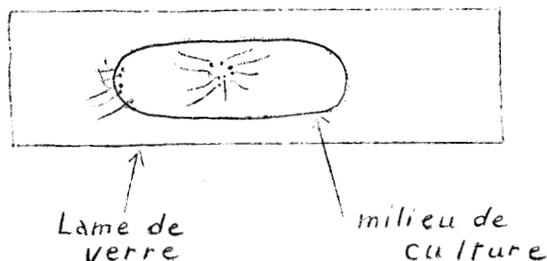
2 noyaux-gamètes dans un tube pollinique de longistyle à la 14ème heure.

Les tubes polliniques les plus longs en fin de germination s'obtiennent quand le pollen est ensemencé en plages importantes. Les grains isolés donnent généralement des tubes moins longs.

Il existe souvent une sorte d'attraction des tubes polliniques, un tactisme de contact schématisé ci-dessous :



- Certaines germinations s'observent sur les bords du milieu de culture. Dans ce cas, les grains reposent sur le milieu, les tubes sont sur la lame de verre. Les échanges de matière se font avec le grain de pollen seul.



Dans la nature, les échanges ne doivent pas se limiter aux grains de pollen, mais ils se font certainement au niveau des tubes polliniques, dans les tissus du stigmate, du style et de l'ovaire.

- Cette germination optimale nous montre des tubes polliniques de brévistyles de 802μ , et des tubes polliniques de longistyles de 770μ .

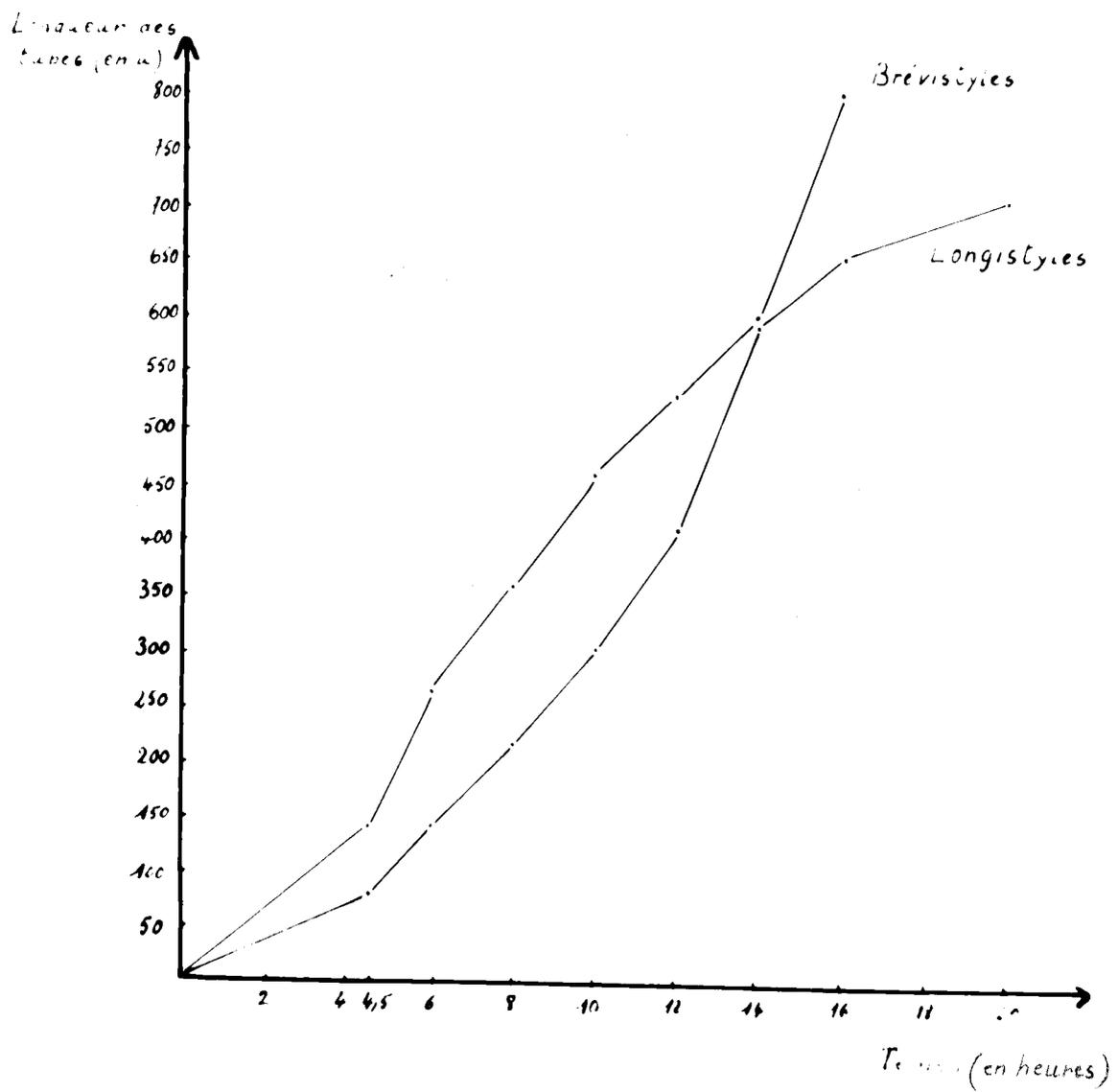
Dans la nature, les longs styles mesurent 7 à 10mm, les styles courts 2 à 3mm.

On pouvait s'attendre à observer des différences de longueur plus marquées en fin de germination.

Peut-être manque-t-il dans le milieu certaines substances agissant à dose infime, ou bien le pistil exerce-t-il une action stimulante sur la croissance ?

- L'écart-type est assez élevé jusqu'à la dixième heure de germination, il diminue ensuite considérablement; le pollen croît de façon plus homogène à partir de ce moment-là.

courbes de croissance des 2 types de pollen

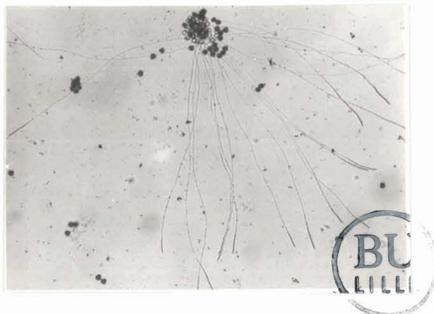


Pollen de Longistyles

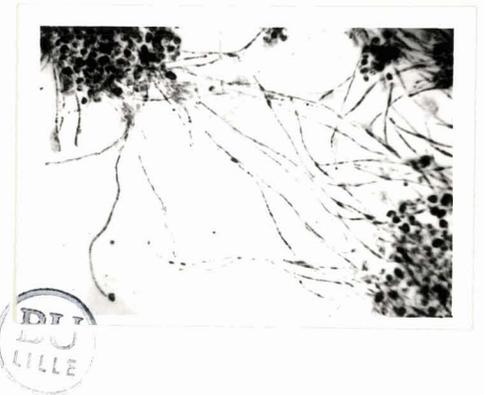
Pollen de Brévistyles (75X)



6heures



14heures



16heures



III - ETUDE DE LA GERMINATION DES DEUX POLLENS ENSEMENCES SUR MILIEUX CONTENANT LE FILTRAT DE BROYATS DE PISTILS DE FLEURS LONGISTYLES OU BREVISTYLES.

1°) - Mode opératoire :

Les pistils sont broyés dans 10 cc d'eau distillée.

Le filtrat est ajouté à 10 cc de milieu de culture dont on double les concentrations en gélose, gélatine et glucose.

2°) - Tableau consignant les résultats obtenus :

Nous gardons les meilleures germinations.

Les mesures concernent les dix tubes polliniques les plus longs.

Les résultats sont donnés par les moyennes $\pm \sigma$.

Temps de germination.	Milieu de culture.	Pollen	Résultats	Moyenne $\pm \sigma$
3 heures	Témoin	de fleurs	1° essai 14-12-17-11-13-10-11-12-15-12 2° essai 9-10-13-13-10-9-10-10-11-11 3° essai 24-25-16-15-15-14-16-17-14-13	49,5 $\mu \pm 14$
	Filtrat de broyats de 8 pistils longistyles	brévistyles	1° essai 18-17-21-23-25-26-22-18-19-16 2° essai 12-13-13-11-13-15-15-12-12-11 3° essai 28-25-20-15-17-26-23-25-28-26	70,6 $\mu \pm 20,3$
	Témoin	de fleurs	1° essai 8-10-9-7-7-8-6-10-11-8 2° essai 13-11-6-10-8-12-10-11-9-10 3° essai 8-9-9-8-7-9-10-11-8-7	31,4 $\mu \pm 7$
	Filtrat de broyats de 8 pistils longistyles	longistyles	1° essai 15-15-11-11-16-18-22-13-15-14 2° essai 24-17-16-22-15-19-16-15-21-17 3° essai 24-19-21-20-26-24-22-19-20-22	67,7 $\mu \pm 14,4$
	Témoin	de fleurs	41-25-35-50-35-30-50-52-42-25	142,4 $\mu \pm 35,5$
	Filtrat de broyats de 10 pistils longistyles	brévistyles	15-22-23-18-19-16-20-20-18-22	64 $\mu \pm 12,2$
4 heures	Témoin	de fleurs	Aucune germination	
	Filtrat de broyats de 10 pistils longistyles	longistyles	Début de germination. (jusqu'à 15 μ)	15 μ
	Témoin	de fleurs	Tubes éclatés 45-50-43-48-60-39-45-51-47-43	174,2 $\mu \pm 20,7$
	Filtrat de broyats de 10 pistils longistyles	brévistyles	Tubes éclatés après 4h de germination	
6 heures	Témoin	de fleurs	Aucune germination	
	Filtrat de broyats de 10 pistils longistyles	longistyles	Tubes éclatés après 4h de germination.	
	Témoin	de fleurs	1° essai 70-71-70-82-80-82-72-75-76-75 2° essai 75-74-76-79-75-77-77-75-74-80	280 $\mu \pm 12,5$
	Filtrat de broyats de 10 pistils brévistyles	brévistyles	1) essai 75-80-80-85-80-75-72-84-85-90 2° essai 90-90-92-95-95-85-80-80-75-75 tubes éclatés 24-15-19-19-23-27-22-21-24-23	307,1 $\mu \pm 13,4$ 80,2 $\mu \pm 11,8$
7 heures	Témoin	de fleurs	80% des tubes éclatés 39-56-41-46-55-49-42-52-51-60	170,5 $\mu \pm 27$
	Filtrat de broyats de 8 pistils longistyles	brévistyles	85% de tubes éclatés	
	Témoin	de fleurs	1° essai 22-24-23-26-21-25-23-22-24-26 2° essai 28-30-45-42-43-41-38-36-28-33	111 $\mu \pm 28,4$
	Filtrat de broyats de 8 pistils longistyles	longistyles	1° essai 51-32-30-33-40-31-36-29-32-31 2° essai 51-57-52-60-46-53-50-71-58-57	163,1 $\mu \pm 47,3$
	Témoin	de fleurs	1° essai 185-220-290-290-215-225-210-215-200-280 2° essai 180-190-200-220-230-205-190-180-225-260	814 $\mu \pm 151,3$
	Filtrat de broyats de 10 pistils brévistyles	brévistyles	1° essai 220-200-217-250-240-230-225-230-275-190 2° essai 190-205-205-190-200-300-205-185-245-225	819 $\mu \pm 107,6$
16 heures	Témoin	de fleurs		
	Filtrat de broyats de 10 pistils brévistyles	brévistyles		

3°) - Conclusion du tableau

- La germination du pollen de brévistyles ne semble guère subir l'influence des extraits de pistils de fleurs brévistyles.

Le pourcentage de germination est toutefois légèrement supérieur.

- Pour le pollen ensemencé en présence d'extraits de pistils longistyles :

- dans certains cas les résultats ne sont pas concluants;

- dans d'autres les deux pollens semblent mieux germer.

(Ces conclusions se déduisent des résultats de germination obtenus entre 3 et 7heures.)

IV - ETUDE DE LA GERMINATION DU POLLEN DE BREVISTYLES EN PRESENCE DE L'ACIDE BORIQUE.

I°) Mode opératoire :

Le milieu de culture est préparé comme précédemment, mais nous doublons les concentrations.

Par exemple, pour préparer un milieu de culture à 0,001% de BO_3H_3 , on fait dissoudre :

- 3g de gélose,
- 2g de gélatine,
- 20g de glucose pur

dans 100cc d'eau distillée, puis on ajoute 100cc de BO_3H_3 à 0,002%.

Le chauffage de BO_3H_3 est évité pour empêcher sa transformation en acide métaborique BO_2H .

Nous réalisons ainsi des milieux à :

- 0,1%
- 0,005%
- 0,0037%
- 0,001%
- 0,0001%.

Nous observons les tubes après 1h - 3H - 6h - 7h30 - 16h de germination.

Les résultats correspondent aux meilleures germinations.

2°) Résultats :

- 1 heure de germination :

Un rapide coup d'oeil nous fournit les pourcentages suivants :

- . 76% des grains commencent à germer sur milieu témoin sans BO_3H_3 .
- . 90% des grains germent sur milieu à 0,005% de BO_3H_3 .

- 3 heures de germination :

- . Pollen-témoin : (12 grains non germés
(42 grains germés 75%
Moyenne de 20 tubes : 27,4 d ou = 101,3 μ

- . Pollenensemencé sur milieu contenant 0,005% de

BO_3H_3 :

- (19 grains non germés 81%
(81 grains germés

Moyenne de 20 tubes : 47,6 d ou 176,1 μ

- . Pollenensemencé sur milieu contenant 0,1% de BO_3H_3 :

Moyenne de 20 tubes : 26,4 d ou 97,7 μ

- 6 heures de germination :

- . Pollen-témoin :

20 mesures :

50-57-62-55-82-90-105-95-76-135-

76-105-46-60-51-75-108-60-75-51-

72,9d ou = 269,7 μ

- . Pollen mis sur milieu contenant 0,0001% de

BO_3H_3 .

20 mesures :

110-120-115-115-120-130-120-125-120-105

120-115-130-115-125-110-110-115-105-115

116,5 d ou = 431 μ

. Pollen mis sur milieu contenant 0,001% de BO_3H_3 .

- 1^o essai : 20 mesures :

100-130-100-110-120-110-115-110-105-100
105-110-120-100-110-120-110-110-105-100

Moyenne : 104,5 d

- 2^o essai : 20 mesures :

140-95-105-110-150-145-100-140-130-145
130-100-140-110-125-120-110-105-105-110

Moyenne : 120,7 d

Moyenne générale : 112,6 d ou 416,6 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant 0,0037% de BO_3H_3 .

20 mesures :

80-85-90-90-90-85-95-100-110-100
100-85-80-75-80-90-95-90-95-95-

Moyenne : 90,5 d ou 334,8 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant 0,1% de BO_3H_3 .

20 mesures :

74-72-69-58-55-49-72-77-74-67
62-63-65-66-68-69-72-59-83-70

Moyenne : 67,2 d ou 249 μ

- 7h30 de germination

. Pollen-témoin :

91-90-88-85-89-85-95-102-104-59
82-84-81-92-97-98-100-101-64-99

Moyenne : 89,1 d ou 330 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant 0,001% de BO_3H_3 .

160-140-145-158-166-172-161-149-155-148
162-166-139-178-182-149-156-200-148-190

Moyenne : 162,2 d ou 600,5 μ

- . Pollenensemencé sur milieu contenant 0,0037% de BO_3H_3 .

140-150-155-135-165-175-170-170-175-180
170-160-145-150-160-155-140-140-150-160

Moyenne : 157,7 d ou 583,4 μ

- . Pollenensemencé sur milieu contenant 0,005% de BO_3H_3 .

110-125-135-95-100-110-115-110-125-120
110-108-100-105-105-100-95-90-95-120

Moyenne : 109 d ou = 403,3 μ

- . Pollenensemencé sur milieu contenant 0,1% de BO_3H_3 .

82-98-100-74-78-86-120-109-76-77
78-87-86-98-88-85-87-94-100-95

Moyenne : 87,2 d ou 323 μ

- 16 heures de germination

- . Pollen-témoin : 20 mesures :

220-215-217-231-256-219-221-223-256-238
206-204-211-215-217-216-231-246-240-114

Moyenne : 220 d ou 814 μ

- . Pollenensemencé sur milieu contenant 0,0001% de BO_3H_3 .

220-240-220-240-220-175-190-165-270-260
220-220-230-240-200-190-220-230-225-220

Moyenne : 219 d ou 810,3 μ

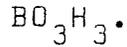
- . Pollenensemencé sur milieu contenant 0,001% de BO_3H_3 .

125-90-100-115-112-114-119-75-90-75
90-90-112-114-90-90-80-85-119-115

Moyenne : 100 d ou 1470 μ

(Id = 14,7 μ au gt 8 x 10)

. Pollen ensemençé sur milieu contenant 0,0037% de

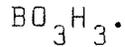


90-90-91-94-96-95-97-92-90-94

91-87-86-89-85-95-100-102-83-83

Moyenne : 91,5 d ou 1346 μ

. Pollen ensemençé sur milieu contenant 0,005% de

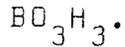


90-95-98-90-95-100-98-90-85-85

90-110-105-100-100-105-90-98-100-100

Moyenne : 96,2 d ou 1414,1 μ

. Pollen ensemençé sur milieu contenant 0,1% de



210-210-211-208-214-215-212-200-242-195

210-211-221-246-218-203-185-188-200-201

Moyenne : 210 d ou 777 μ

Tableau récapitulatif :

C \ Tps	0,1%	0,005%	0,0037%	0,001%	0,0001%	Témoin (0%)
3h	97,7	81% 176,1				75% 101,3
6h	249		334,8	416,6	431	269,7
7h $\frac{1}{2}$	323	403,3	583,4	600,5		330
16h	777	1414,1	1346	1470	810,3	814

Les chiffres représentent les longueurs des tubes en microns.

3°) Interprétation :

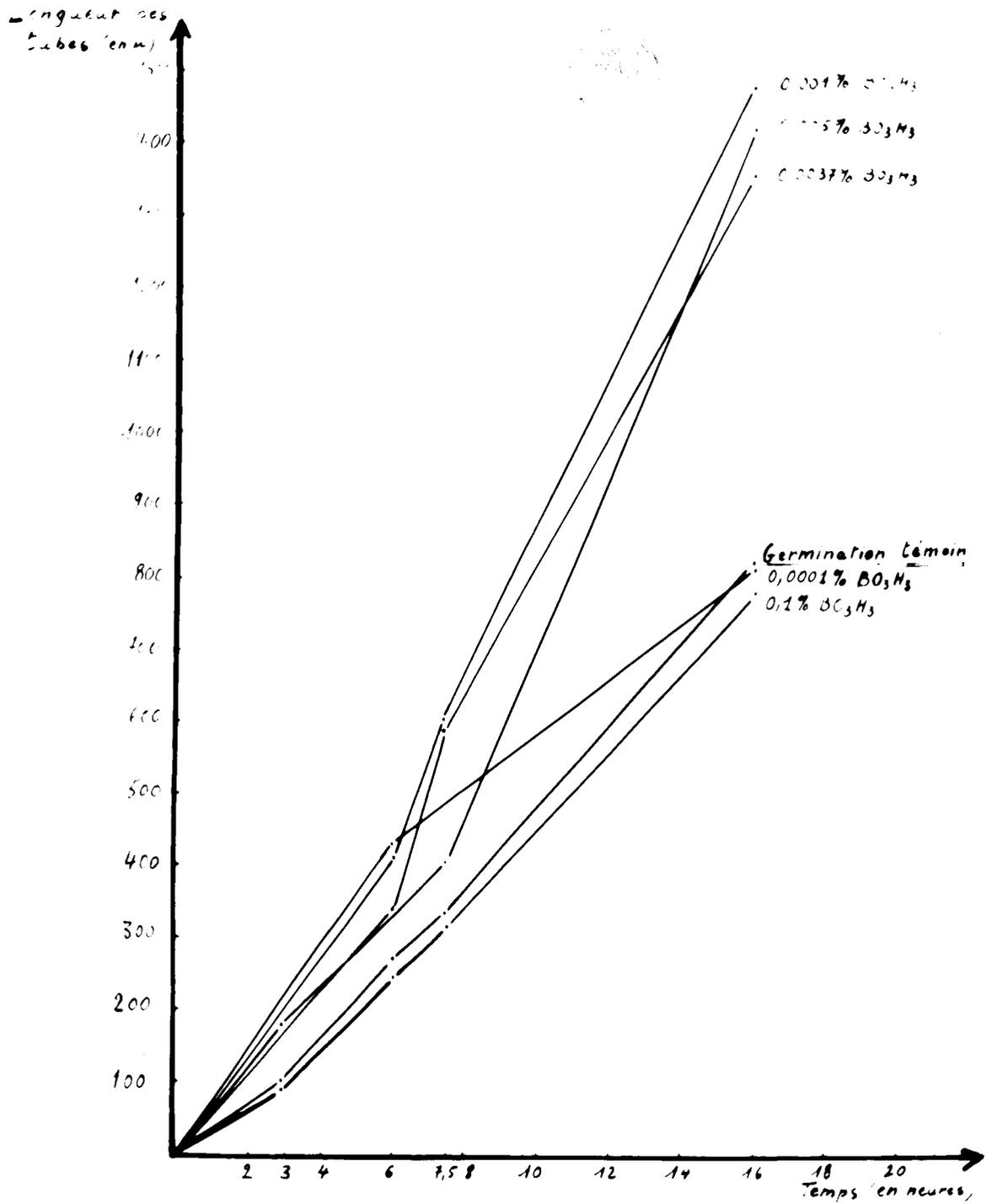
- A 0,1% de BO_3H_3 la courbe de croissance est sensiblement identique à celle des tubes-témoins.
- L'optimum de croissance s'obtient à 0,001% de BO_3H_3 après $7\text{h}\frac{1}{2}$ comme à 16h .

Les tubes croissent plus vite et n'éclatent pas tous après la 16ème heure. (50% n'éclatent pas).

L'acide borique accélère la croissance et agit pendant toute la durée de la germination.

- A 0,0001% de BO_3H_3 la croissance des tubes est activée mais à 16h, la longueur des tubes est sensiblement la même que dans les conditions normales.

croissance des tubes polliniques de brévistyles sur milieux contenant BO_3H_3



Pollen de brévistyles. (Gt. 130)

témoin

extrait de 10 pistils
de brévistyles.



BO_3H_3 0,005%

6h



BO_3H_3 0,0037%



BO_3H_3 0,001%

6h



en atmosphère d'oxygène.



témoin (Gt. 75)

6h



BO_3H_3 0,001% (Gt. 75)



16h



V - INFLUENCE RECIPROQUE DES DEUX TYPES DE POLLEN DANS LA GERMINATION.

Un grain de pollen de brévistyle ayant germé parmi un amas de pollen de longistyles est à l'origine de cette étude. Ce grain de pollen engendre un tube mesurant 444μ 6heures après l'ensemencement. (La moyenne des tubes de brévistyles après 6heures est de 262μ).

Outre cette différence de longueur, on observe une cyclose bien visible des organites intracytoplasmiques du tube. Cette cyclose est ordinairement peu nette dans les tubes germant sur milieu témoin.

- 1^o essai :

Nous prélevons deux anthères sur une fleur de chaque type.

Nous disposons sur une même lame le contenu de deux anthères de type différent.

Le pollen des deux anthères restantes est semencé sur des lames distinctes, et sert de témoin.

Conclusion :

Après 6 heures de germination, les deux pollens mélangés en proportion I/I fournissent les résultats suivants :

- Les tubes polliniques de brévistyles ne semblent avoir subi aucune influence.
- Ceux de longistyles sont plus longs qu'en germination normale; leur cyclose est ici encore bien visible.

Le pollen de brévistyles paraît contenir une substance qui provoque une activation de la croissance et une réaction du cytoplasme des tubes de longistyles.

Ces modifications sont encore observables à la 16ème heure.

- 2° essai :

Nous considérons l'âge du pollen.

Le pollen, prélevé le jour de l'anthèse, est appelé pollen frais.

Celui prélevé 2 à 3 jours après la déhiscence des anthères est nommé pollen âgé.

Nous utilisons les deux pollens dans différentes combinaisons. Celles-ci sont nombreuses et schématisées ci-dessous pour permettre la consignation des résultats dans un tableau.

Pollen Temps	PtaL	PtfL	PtaB	PtfB	qqBf + La	qqBa + La
	Mesures (en divisions du micromètre)					
	qqBf	La	qqBa	La		
6 heures	: 39,40	: 19,20	: 65,70	: 55,55		
	: 40,45	: 28,30	: grains	: 75,84	: tubes	: 60,60
	: 48,53	: 32,35	: éclatés	: 85,87	: très	: 70,70
	: 59,59	: 40,40		: 88,90	: courts	: 71,72
	: 59,60	: 43,50		: 90,92		: 74,80
	: M =	: M =	: M =	: M =	: M =	: M =
	: 185,7	: 128,3	: 0	: 305,6	: 0	: 248,6
16 heures	: tubes	: 85,90		: 142,145		: 65,85
	: éclatés	: 95,110		: 160,165		: 90,95
	: après	: 115,125		: 185,195		: 96,100
	: 6h.	: 128,130		: 200,235		: 105,108
		: 138,140		: 245,260		: 110,115
	: M =	: M =	: M =	: M =	: M =	: M =
	: 185,7	: 427,7	: 0	: 714,8	: 0	: 358,5

Légende :

- P.t.a.L.= Pollen témoin âgé, de fleur longistyle.
- P.t.f.L.= " " frais, " "
- P.t.a.B.= " " âgé, de fleur brévistyle.
- P.t.f.B.= " " frais " "
- qq.Bf + La = Quelques grains de pollen frais de brévistyle mélangés à une quantité importante (1 anthère) de pollen âgé de Longistyle.
- qq.Ba + La = Quelques grains de pollen âgé de brévistyle mélangés à une quantité importante de pollen âgé de Longistyle.

qqBf + Lf	qqBa + Lf	qqLa + Bf	qqLa + Ba
Mesures (en divisions du micromètre)			
qqBf	Lf	qqBa	LF
: 85,105	: 70,72	: 9,9	: 50,55
: 110,110	: 78,80	: 10,10	: 55,55
: 115,117	: 80,82	: 11,12	: 58,60
: 120,120	: 82,86	: 13,14	: 60,65
: 120,125	: 92,95	: 16,20	: 68,70
: M =	: M =	: M =	: M =
: 417	: 302,2	: 45,8	: 220,5
: tubes	: 90,90	: 120,125	: 125,135
: éclatés	: 95,100	: 130,140	: 140,140
: après	: 100,110	: 140,145	: 146,148
: 6 heures	: 120,125	: 145,150	: 150,160
	: 130,140	: 152,160	: 182,184
: M =	: M =	: M =	: M =
: 417	: 407	: 520,5	: 558

Légende :

- qq.Bf+Lf = Quelques grains de pollen frais de brévistyle mélangés à une quantité importante de pollen frais de longistyle.
- qq.Ba+Lf = Quelques grains de pollen âgé de brévistyle mélangés à une quantité importante de pollen frais de longistyle.
- qq.La+Bf = Quelques grains de pollen âgé de longistyle mélangés à une quantité importante de pollen frais de brévistyle.
- qq.La+Ba = Quelques grains de pollen âgé de longistyle mélangés à une quantité importante de pollen âgé de brévistyle.

Conclusions du tableau :

- Après 6heures de germination :

- Le pollen âgé de longistyle, qui germe mal, ne semble pas recevoir d'activation par le pollen de brévistyles.
- Le pollen frais de longistyle semble mieux germer au contact du pollen de brévistyle, frais de préférence.
- Le pollen âgé de brévistyle ne germe pas ou très mal. Au contact du pollen âgé de longistyle, les tubes obtenus sont plus longs.
- Le pollen frais de brévistyle semble recevoir une activation du pollen frais de longistyles.

Le pollen frais des deux types de fleurs de *Primula obconica* semble exercer une action réciproque de stimulation en début de germination.

- Après 16heures de germination :

- Les préparations observées ne montrent pas de différences notables dans la longueur des tubes polliniques. L'influence réciproque des deux pollens semble donc disparaître en fin de germination.

VI - INFLUENCE DU pH ACIDE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA GERMINATION
DU POLLEN DE FLEURS BREVISTYLES.

1°) - Mode opératoire :

Nous réalisons des solutions-tampons à différents pH en mélangeant du phosphate monopotassique (PO_4H_2K) ou de l'acide succinique à du borate de sodium.

$3 < pH < 5,8$:

Borax : 19,1g dissous dans 1 litre d'eau distillée

Acide succinique : 5,9g " " " "

$6 < pH < 9$

Borax : 10,1g " " " "

PO_4H_2K : 13,62g " " " "

Nous mélangeons des quantités convenables de ces substances jusqu'à obtention des pH désirés soit les

pH 3 - 4 - 5,7 - 6,5 - 7.

Ils sont mesurés au pHmètre électrique sensible à la 1ère décimale.

Au milieu de culture, nous ajoutons quelques cc de solutions-tampons. Ils remplacent le même nombre de cc d'eau distillée, retirée auparavant pour garder les mêmes concentrations en agar-agar, gélatine, glucose.

2°) - Résultats

- Après 6h. de germination :

Une centaine de grains est examinée pour les pourcentages.

- Pollenensemencé à pH3 :

1° essai : 44% de grains germés

2° essai : 72%

Moyenne : 58%

Moyenne des longueurs de 20 tubes = (4 essais)

15 - 20 - 0 - 13

soit 12d ou 44,4

Les grains non germés sont en partie éclatés,
en partie non mouillés.

- Pollenensemencé à pH4 :

1° essai : 91%

2° essai : 57% de grains germés.

Moyenne : 74%

Moyenne des longueurs de 20 tubes = (4 essais):

43 - 0 - 45 - 17

soit 19d ou 70,3

- Pollenensemencé à pH 5,7 :

1° essai : 45%

2° essai : 53% de grains germés

Moyenne : 49%

Longueur des tubes :

1° essai :

75-70-75-75-90-75-90-90-75-70
70-75-50-100-95-75-75-130-95-90 M = 77 d

2° essai :

30-34-35-40-42-50-40-38-30-28
40-40-50-43-42-40-50-30-38-26 M = 38,7d

3° essai :

25-28-32-30-29-30-31-30-29-30
27-28-27-25-15-19-30-32-30-28 M = 27,7d

4° essai :

70-70-55-80-60-65-40-50-65-70
40-55-50-60-80-65-70-70-70-65 M = 62,7d

Moyenne générale : 51,5d ou 190,5

Presque tous les grains ont éclaté.

- Pollenensemencé à pH6,5 :

1° essai : 63%

de grains germés

2° essai : 75%

Moyenne : 69 %

Longueur des tubes :

1° essai :

50-30-20-35-25-40-45-30-25-35
30-30-25-35-40-30-35-30-35-30 M = 32,7d

2° essai :

60-70-80-90-90-65-70-70-75-70
60-55-60-55-60-65-60-60-70-75 M = 68d

3° essai :

60-55-50-70-80-90-75-75-70-60 M = 63,7d
80-60-50-65-60-60-45-50-45-75

4° essai :

40-45-40-42-50-55-47-46-46-44 M = 46,5d
40-50-42-40-38-50-55-60-49-51

Moyenne générale : 52,7 d ou 194,9 μ

Presque tous les tubes ont éclaté.

- Pollen ensemencé à pH7 :

1° essai : 44% de grains germés

2° essai : 80%

Moyenne : 62%

Longueur des tubes :

1° essai :

60-75-70-60-45-48-52-61-39-36 M = 53,6d

60-64-36-60-55-65-65-66-54-60
quelques tubes éclatés

2° essai :

75-55-55-100-100-100-80-65-100-110

60-65-75-75-100-75-80-85-85-90 M = 81,5d

tubes non éclatés

3° essai :

70-75-90-65-80-60-80-80-70-70

90-90-80-90-80-85-90-70-80-95 M = 82,5d

tubes non éclatés

4° essai :

60-80-85-75-55-52-57-49-70-71

48-52-55-56-70-60-75-60-45-57 M = 61,6d

quelques tubes éclatés

Moyenne générale : 77,3 d ou 286 μ

- Pollen témoin ensemencé sur milieu normal =
(pH 7).

1° essai : 72%
2° essai : 96%
Moyenne : 84%
de grains germés

Longueur des tubes :

1° essai :

55-54-56-62-49-51-50-51-57-60 M = 54,5d
57-50-49-56-62-64-60-48-49-50

2° essai :

65-60-55-55-53-60-80-53-55-55
65-65-70-65-55-70-60-50-62-63 M = 60,8d

3° essai :

50-62-72-85-95-90-90-65-62-80
64-56-65-75-90-88-72-70-85-80 M = 74,8d

4° essai :

72-49-53-82-47-55-71-78-81-52
75-72-50-46-43-50-62-63-59-66 M = 61,3d

Moyenne générale : 62,8d ou 232,3 μ
10% des tubes éclatés.

- Après 16H. de germination =

- Le pollen ensemencé aux pH 3 - 4 - 5,7 et 6,5
présente des tubes éclatés en partie ou tota-
lement à la 6ème heure.

Leur longueur est sensiblement égale à celle
des tubes polliniques après 6heures de germina-
tion.

- Pollen ensemençé à pH 7 :

1° essai : M = 53,6d

2° essai :

I90-I80-I80-210-I90-I90-I85-I65

200-200

I70-I70-I60-I80-90-95-I10-200

I25-I90 M = 168,5d

3° essai :

I70-I80-I82-I98-I92-I07-I09-214

I05 I80

I95-200-I70-I75-I80-I06-I38-I40

I25 I20 M = 158,8d

4° essai : M = 61,6d

Moyenne générale : 111,1d ou 411 μ

- Pollen-témoin ensemençé sur milieu de culture normal (pH # 7).

1) essai :

65-70-75-70-50-53-65-62-73-75

70-68-70-72-58-55-60-74-45-55

M = 64,1d ou 942,2 μ

2) essai :

158-214-243-256-221-300-250-245-270-I57

240 220 216 212 230 245 200 198 216 215

M = 225,3d ou 833,6 μ

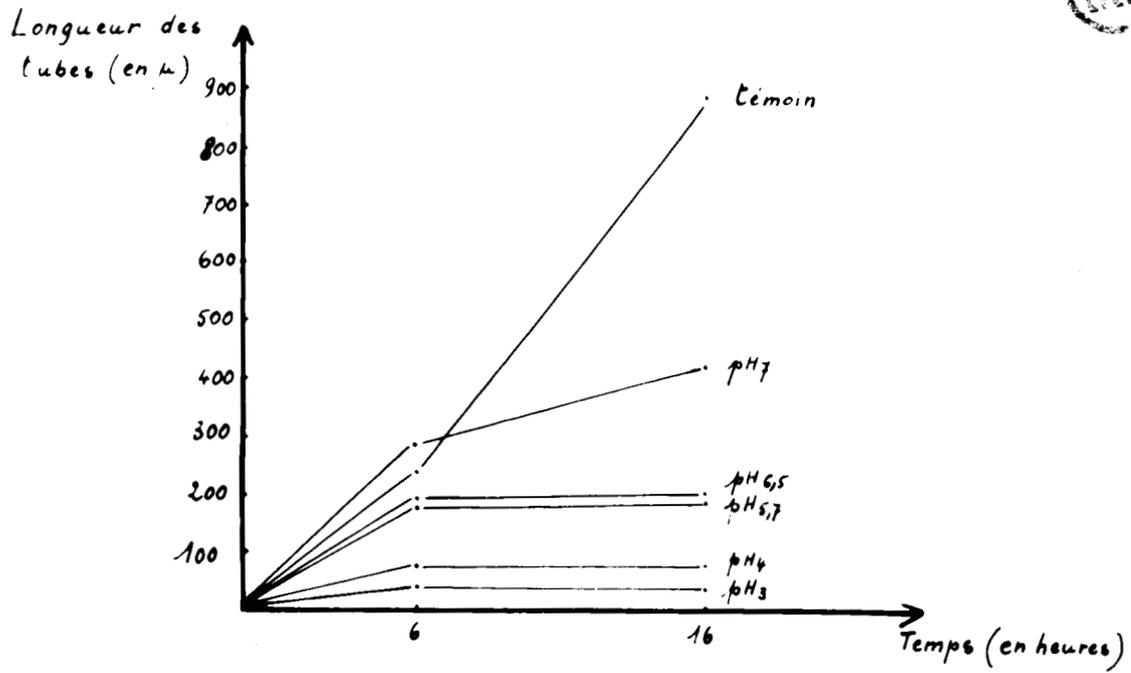
Moyenne générale : 887,9 μ



Tableau récapitulatif :

pH	% de grains germés après 6h.	Longueur des tubes polliniques après 6h. (en μ)	longueur des tubes polliniques après 16h. (en μ)
3	58%	44,4	44,4
4	74%	70,3	70,3
5,7	49%	190,5	190,5
6,5	69%	194,9	194,9
7	62%	286	411
milieu témoin (#7)	84%	232,3	887,9

croissance des tubes polliniques de brévistyles en fonction du pH du milieu de culture



Conclusions du tableau :

1°) - Les pourcentages de germination sont assez forts, moins élevés cependant que sur milieu normal sans solution tampon.

Les grains sont presque tous gonflés, la germination débute mais ne peut continuer.

2°) - A pH7 seulement, la longueur des tubes atteint sensiblement celle obtenue en germination normale; les tubes éclatent vers 16 heures.

Aux autres pH, ils éclatent tous vers 6 heures.

3°) - Les substances intervenant dans la composition des solutions-tampons doivent jouer un rôle néfaste puisque tous les tubes éclatent très tôt, même à pH neutre.

Certains auteurs ont signalé d'ailleurs la toxicité des ions Na^+ dans les milieux de culture.

Les meilleurs résultats ayant été obtenus à pH7, nous essayons dans une seconde partie les pH suivants: 6,5 - 6,7 - 6,8 - 7.

Nous indiquons uniquement les moyennes de 2,3 ou 4 essais comprenant chacun 20 mesures.

- Après 6 heures de germination :

- pH = 6,5 Moyennes :
- 40,4 d
 - 55,5 d
 - 52,8 d
 - 44,9 d

Moyenne générale : 48,4 d ou 179 μ

- pH = 6,7 Moyennes :
- 56,2 d
 - 40,8 d

Moyenne générale : 48,5 d ou 179,4 μ

- pH = 7 Moyennes :
- 45,9 d
 - 51,3 d
 - 62,6 d

Moyenne générale : 53,3 d ou 197,2 μ

- Milieu normal (pH = 7) Moyennes :
- 74 d
 - 62 d

Moyenne générale : 68 d ou 251,6 μ

- Après 16 heures de germination :

Dans tous les cas où nous employons des solutions tampons, les tubes éclatent entre 6 et 8 heures de germination.

A pH7 les tubes éclatent vers la 16ème heure. Ils ne dépassent pas 740 microns.

Le pollen-témoin donne des tubes polliniques atteignant 1007 microns.

Conclusion :

Les pH voisins de la neutralité sont les plus favorables.

Il semble exister dans les solutions tampons des substances qui abrègent la durée de germination en faisant éclater les tubes.

L'éclatement précoce des tubes ne doit pas faire penser à une activation de maturation, car les noyaux-gamètes ne sont jamais visibles à la 6ème heure.

VII - ESSAI DE GERMINATION DU POLLEN DE FLEURS BREVISTYLES EN PRESENCE D'UNE ATMOSPHERE D'OXYGENE.

- 1°) Mode opératoire :

Une cuve à lames est placée sous une cloche de verre reposant sur une cuvette d'eau maintenue à 25°C.

On fait passer un courant d'oxygène à la pression atmosphérique dans la cloche. L'ensemble est placé ensuite en étuve. L'oxygène est renouvelé d'heure en heure.

- 2°) Résultats après 6 heures de germination :

5 essais : 10 mesures correspondant aux tubes les plus longs. Pour chaque essai, nous utilisons le pollen de fleurs différentes.

a) Pollen-témoin :

- 1° essai = 70-71-70-82-80-82-72-75-75-76
- 2° " = 75-74-76-79-75-77-77-75-74-80
- 3° " = 74-71-67-69-80-70-76-74-72-70
- 4° " = 70-71-66-69-68-84-82-89-72-70
- 5° " = 130-90-110-86-105-100-98-100-110-82

Moyenne générale : 79,7 d ou 294,8 μ

b) Pollen ensemencé en atmosphère d'oxygène :

- 1° essai = 85-75-85-85-75-80-80-85-80-135
- 2° " = 110-95-115-115-115-110-90-90-120-110
- 3° " = 125-110-100-105-95-95-95-100-100-110
- 4° " = 110-110-100-90-110-90-95-100-100-95
- 5° " = 95-90-95-100-100-110-90-80-70-65

Moyenne générale : 97,2 d ou 359,6 μ

- 3°) Après 16 heures de germination :

Les tubes placés en atmosphère d'oxygène mesurent approximativement la même longueur que ceux du pollen-témoin.

La faible différence existant après 6 heures s'estompe donc en fin de germination.

VIII - ESSAIS DE GERMINATION DES DEUX POLLENS SUR MILIEUX DE CULTURE
CONTENANT CHACUN UN SUCRE PUR :

Les sucres sont dissous dans le milieu de culture,
à raison de 10%.

Nous essayons le saccharose, le lactose, le xylose,
l'arabinose, le galactose, le fructose et le glucose com-
me milieu témoin.

Le pollen d'une même fleur est ensemencé sur ces
différents milieux de culture.

Les chiffres indiquent les mesures des 10 ou 20
tubes polliniques les plus longs.

- I°) Résultats des germinations après 6 heures :

Pollen de brévistyles =

- Pollen ~~témoin~~ ensemencé sur milieu à glucose :

52-48-40-60-82-80-76-50-41-63 M = 59,2d ou 219 μ

- Pollen ensemencé sur milieu à sucrose :

1) 95-90-100-60-75-60-75-60-90-55

2) 60-70-70-80-80-85-75-70-75-75 M = 70 d ou 259 μ

- Pollen ensemencé sur milieu à lactose :

1) 145-120-135-115-117-111-112-140
135-150

2) 130-138-126-141-139-112-116-150
133-126 M = 129,5d ou 479,1 μ

Les autres sucres n'ont donné aucun résultat.

- Pollen de longistyles :

Les essais suivants sont réalisés avec le lactose étant donné les résultats satisfaisants obtenus auparavant.

. Pollen-témoin sur milieu à glucose :

1° essai =

52-57-58-53-50-52-53-50-51-49- M = 52,5 d

2° essai =

45-48-37-43-51-60-49-39-43-44 M = 45,9 d

3° essai =

45-52-56-58-53-63-61-59-58-52 M = 55,7 d

4° essai = aucune germination.

Moyenne générale:

51,3d ou 189,8

. Pollen ensemencé sur milieu à lactose :

1° essai =

83-90-94-100-95-97-90-85-88-86 M = 90,8 d

2° essai =

82-84-100-83-75-70-72-77-74-71 M = 78,8 d

3° essai =

100-100-96-92-86-103-110-114-108

102 M = 107,1 d

4° essai : aucune germination.

Moyenne générale : 92,2d ou 341,1

Conclusion :

Le lactose est le sucre le plus favorable dans la germination des deux types de pollen de *Primula obconica*.

Après 6 heures de germination, les tubes ont une longueur quasi double; la cyclose est considérablement activée.

La molécule de lactose est formée de galactose et de glucose. Le galactose seul ne donne pas de bons résultats; l'élément actif serait donc le glucose. Le galactose lui permettrait néanmoins d'être plus actif.

Le même raisonnement peut être tenu pour le sucrose, puisque le fructose ne donne pas de résultats.

- 2°) Résultats en fin de germination.

- Pollen de brévistyles-témoins : (environ 16h.)

1) 195-270-275-185-200-230-225-180-195-
200 M = 215,5d

2) 162-183-175-190-225-215-210-200-183
255 M = 199,8 d

3) 210-163-200-305-290-195-190-225-200
145 M = 212,3 d

Moyenne générale : 212,5d ou 786,2 μ

- Pollen de brévistyle ensemencé sur milieu à lactose (environ 24-48 heures).

(48h) 1) 520-535-800-700-800-760-660-652-
740-750 M = 691,7 d

(24h) 2) 360-380-400-420-330-450-475-470
510-370 M = 416,5 d

(48h) 3) 344-300-308-340-332-316-360-368
368-384 M = 344 d

Moyenne générale : 484d ou 1790 μ

- Pollen de longistyles témoin : (environ 16h)

1) Mauvaise germination : quelques grains germés.

2) 240-310-280-260-235-215-185-208-215-210 M =235,8d

3) 225-235-240-253-265-282-208-214-225-265 M =241,2d

Moyenne générale : 238,5d ou 862,4 μ

- Pollen de longistyles, ensemencé sur milieu à lactose:

(48h) 1) 120-110-112-107-100-97-103-110-125-110 M =109,4

(24h) 2) 100-123-110-114-108-110-115-120-110-115 M =112,5

(48h) 3) 140-155-160-145-155-165-175-145-155-160 M =155,5

Moyenne générale : 125,8d ou 1837,5 μ

Conclusion :

Pour un même pollen, la durée de germination est beaucoup plus longue sur milieu contenant du lactose que sur milieu glucosé.

Sur milieu glucosé, les tubes polliniques-témoins éclatent entre la 15ème et la 16ème heure de germination.

Sur milieu contenant 10% de lactose, les tubes polliniques n'éclatent pas avant 24 heures.

Il en résulte des tubes polliniques plus longs.

Le lactose active la croissance en début de germination, les tubes polliniques sont plus longs après la 6ème heure et la cyclose plus active.

Le rôle du lactose semble différent dans la suite de la germination.

Si deux tubes polliniques de longistyle sont placés dans les mêmes conditions, l'un sur milieu glucosé, l'autre sur milieu à lactose, leur croissance est différente.

Le premier mesure 190 microns après 6 heures - 862 microns après 16 heures et éclate, le second mesure 341 microns après 6 heures - 975 microns après 16 heures et n'éclate pas.

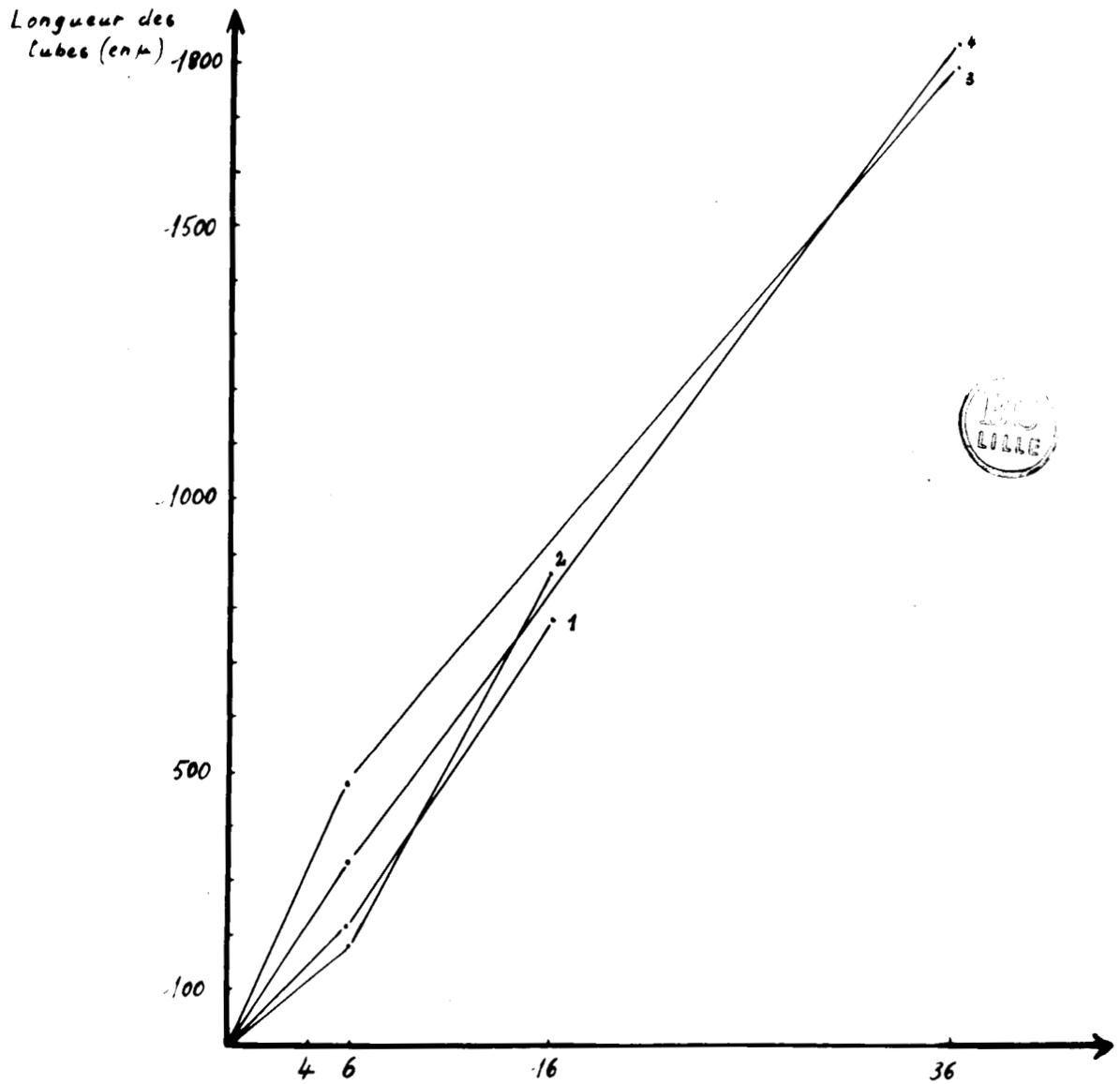
La vitesse de croissance des tubes est environ deux fois plus grande sur milieu à lactose en début de germination, mais cette vitesse diminue avec le temps. Cette diminution est compensée par un non-éclatement du tube pollinique qui laisse supposer que le lactose règle la pression osmotique des tubes polliniques.

Les noyaux-gamètes observables après 16 heures sur milieu glucosé après coloration au carmin acétique ferrique, ne sont visibles, sur milieu à lactose, qu'après 24 heures.

Ceci nous amène à penser que la 2ème mitose pollinique n'est pas fonction absolue du temps, mais plutôt de la nature du milieu de culture.

Le pollen de fleurs longistyles donne, sur milieu à lactose, des tubes atteignant 1.800 microns de moyenne, les plus longs mesurant 2.300 microns; c'est à peu près leur longueur en germination naturelle.

croissance des tubes polliniques sur milieux à glucose et à lactose



- | | | | |
|----|---------------------------------|--|-----------------|
| 1. | Tubes polliniques de brévisyles | (témoin sur Glucose) | Temps en heures |
| 2 | " | " Longistyles | " |
| 3 | " | " brévisyles (Germination sur lactose) | " |
| 4 | " | " Longistyles | " |

IX - RECHERCHE DE L'INFLUENCE DE TROIS ACIDES ORGANIQUES SUR LA GERMINATION DES DEUX POLLENS :

- L'ACIDE β INDOLE-ACETIQUE.
- L'ACIDE β INDOLE-PROPIONIQUE.
- L'ACIDE α NAPHTALENE ACETIQUE.

- I°) Mode opératoire :

Il consiste à préparer des milieux de culture normaux mais doublement concentrés en agar-agar, gélatine, glucose.

On prend 10 cc. de milieu de culture, on fait dissoudre les différentes substances, puis on ajoute des solutions des différents acides à concentration 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} g/l.

Nous obtenons ainsi des milieux dont la concentration en acides organiques est respectivement de 5×10^{-6} g/l, 5×10^{-7} g/l, et 5×10^{-8} g/l.

Nous recherchons la concentration optimum, c'est-à-dire celle fournissant les meilleurs résultats dans la germination, en particulier dans la croissance des tubes polliniques.

Chaque essai nous fournit les valeurs des 10 tubes polliniques les plus longs.

Le pollen d'une seule fleur a suffi à l'ensemencement des trois milieux correspondant aux trois acides pour une concentration donnée.

- 2°) Résultats :

a) - Pollen de brévistyles après 6h. de germination :

- Concentration en acides : 5×10^{-6} g/l.

. Pollen-témoin : (sans acide organique)

45-60-52-48-49-55-60-55-58-50 Moyenne :
53,2d ou 197,8 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant de

l'acide β indole-propionique :

62-64-70-80-72-68-69-59-62-65 M = 67,1

80-90-90-92-99-103-102-110-112

120 M = 99,8

Moyenne générale : 83,4d ou 308,5 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant de

l'acide β indole-acétique :

70-72-60-75-82-78-70-74-72-75

Moyenne : 72,8d ou 269,3 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant de

l'acide α naphthalacétique :

75-82-86-89-90-75-92-100-94-65 M = 84,8d

100-155-115-120-112-107-100-95

96 103 M = 110,3d

100-92-75-72-69-67-55-94-86-81 M = 79,1 d

Beaucoup de tubes ont éclaté.

Moyenne générale : 91,4d ou 338,1 μ

- Concentration en acides : 5×10^{-7} g/l

. Pollen-témoin : (sans acide organique)

52-48-40-60-82-80-76-50-41-63

Moyenne : 59,2d ou 219 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant de l'acide β indole-propionique :

85-75-90-91-94-90-87-83-80-84 M = 85,9d

83-70-72-81-76-74-66-59-74-83 M = 73,8d

Moyenne générale : 79,8d ou 294,2 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant de l'acide β indole-acétique :

120-125-135-130-145-75-82-79

112 130

Moyenne : 110,6d ou 409,2 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant de l'acide α naphtalacétique :

100 92 83 82 98 101 104 108 105

100

Moyenne : 97,3d ou 360 μ

- Concentration en acides : 5×10^{-8} g/l

. Pollen-témoin :

90-94-102-106-95-105-112-100

96-84

M = 98,4 d

60-64-63-68-69-74-81-72-76-74

M = 70,1 d

Moyenne générale : 84,2d ou 312 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant de l'acide β indole propionique :

120-112-110-108-95-103-110-125

134-120

Moyenne : 113,7d ou 420,6 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant de
l'acide β indole acétique :
I40-I35-I70-I50-I02-II2-II0-I25
I30-I45 M = 132,4d
75-78-82-86-83-72-70-73-70-82 M = 77,1d
Moyenne générale : 104,7d ou 387,3d

. Pollenensemencé sur milieu contenant de
l'acide α naphthalacétique :
I50-I63-I5I-I48-I47-I39-I28-I43
I4I-I38 M = 144,8d
75-72-83-85-89-88-80-77-72-75 M = 79,6d
Moyenne générale : 112,2d ou 415,1d

b) - Pollen de brévistyles après 16h. de germination

- Concentration en acides : 5×10^{-6} g/l.

. Pollen-témoin. (Sans acide organique)
I95-270-275-I85-200-230-225-I80
I95-200

Moyenne : 215,5d ou 797,3d

. Pollenensemencé sur milieu contenant de
l'acide β indole propionique
340-360-280-270-285-340-352-327
332-310

Moyenne : 319,6d ou 1182,5d

. Pollenensemencé sur milieu contenant de
l'acide β indole acétique :
Les tubes germent, ils sont courts et
éclatent peu de temps après 6 heures.

- . Pollenensemencé sur milieu contenant de l'acide α naphtalacétique :

100 170 190 290 185 190 175 170
240-175 M = 187,5

170-300-160-155-152-143-170-130
150-205 M = 173,5

Moyenne générale : 180,5d ou 667,8 μ

- Concentration en acides : 5×10^{-7} g/l.

- . Pollen-témoin : pollen mal germé :
72-80-83-110-94-105-87-75-83-67

Moyenne : 85,6d ou 316 μ

- . Pollenensemencé sur milieu contenant de l'acide β indole propionique :

100-115-130-118-123-100-96-98-95-101

Moyenne : 107,6d ou 398,1 μ

- . Pollenensemencé sur milieu contenant de l'acide β indole acétique :

260-265-220-160-168-220-180-172
240-360

Moyenne : 224,5d ou 930,2 μ

- . Pollenensemencé sur milieu contenant de l'acide α naphtalacétique :

150-140-134-142-151-139-127-112
115-155

Moyenne : 136,5d ou 505,5 μ

- Concentration en acides : 5×10^{-8} g/l

. Pollen-témoin : (sans acide organique)

265-245-300-280-275-320-310-315
318-400

Moyenne : 302,8d ou 1120,3 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant de
l'acide β indole propionique :

650-600-620-630-625-630-580-635
550-640

Moyenne : 616 d ou 2279 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant de
l'acide β indole acétique :

400-380-390-410-380-370-372-385
388-400

Moyenne : 387,5d ou 1433,7 μ

. Pollenensemencé sur milieu contenant de
l'acide α naphtalacétique :

420-360-370-420-430-365-382-390
410-400

Moyenne : 394,7d ou 1460,3 μ

Des essais de germination de pollen de fleurs longistyles en présence de ces trois acides organiques ont été réalisés à la concentration 10^{-8} g/l.

Les mesures n'ont pas été faites, mais nous avons photographié les différentes cultures après 6 heures de germination.

Globalement, les résultats sont identiques à ceux observés dans la germination du pollen des fleurs brévistyles.

- 3°) Tableau récapitulatif

Les chiffres représentent les valeurs des longueurs
des tubes polliniques en μ

Tps	Nature des A, A. Conc.	Ac. β in- dole pro- pionique.	Ac. β indo- le acéti- que.	Ac. α naph- talacéti- que.	Témoin
	5×10^{-6}	308,5	269,3	338,1	197,8
6h.	5×10^{-7}	294,2	409,2	360	219
	5×10^{-8}	420,6	387,3	415,1	312
	5×10^{-6}	1182,5	Tubes éclai- tés après 6 heures.	667,8	797,3
16h.	5×10^{-7}	398,1	930,2	505,5	316
	5×10^{-8}	2279	1433,7	1460,3	1120,3

Le meilleur résultat s'obtient pour les trois acides organiques, à la concentration 5×10^{-8} g/l. L'acide β indole propionique est le plus efficace.

L'action produite sur les tubes polliniques en début de germination est identique à celle fournie par le lactose. Contrairement à celui-ci, les acides organiques ne prolongent pas la germination dans le temps; la croissance est donc réellement activée pendant toute la durée de germination.

Après 16 heures de germination, les tubes de brévistyles croissant sur milieu contenant de l'acide β indole propionique, mesurent 2279 microns de moyenne. Ils atteignent 1790 microns sur milieu à lactose après 24 - 48 heures seulement.

Enfin, la cyclose reste nettement visible pendant toute la durée de la germination, elle peut même se prolonger après l'éclatement du tube, durant quelques minutes.

L'étude de la germination des deux types de pollens de *Primula obconica* a été faite :

- sur milieu gélosé + gélatine + lactose + BO_3H_3 ;
- sur milieu gélosé + gélatine + lactose + acide β indole propionique;
- sur milieu gélosé + gélatine + lactose + acide β indole acétique;

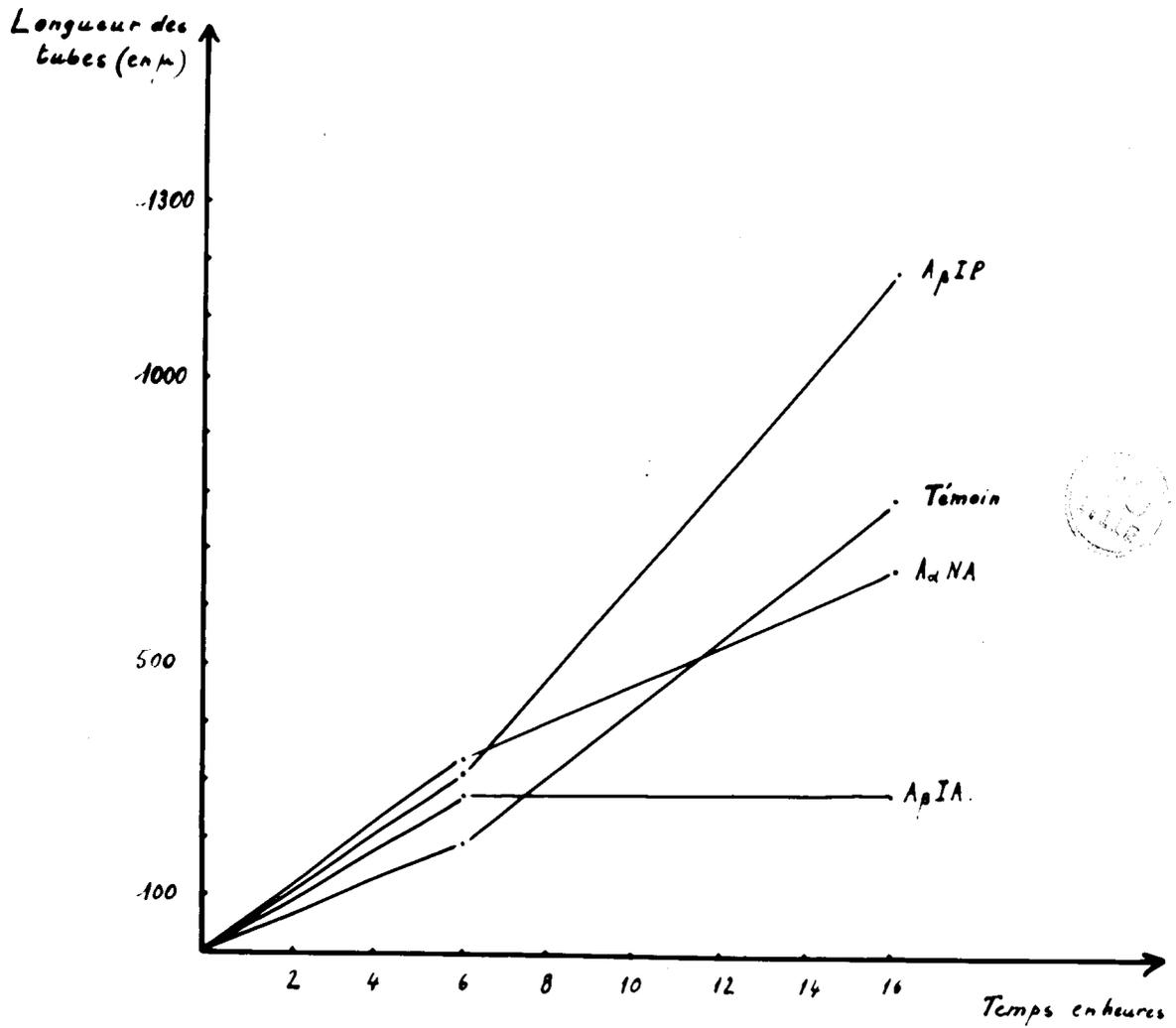
- sur milieu gélosé + gélatine + lactose + acide α naphtalacétique.

Les actions stimulantes de ces différentes substances, très nettes quand celles-ci sont introduites séparément dans le milieu de culture, ne s'additionnent pas dans ces essais.

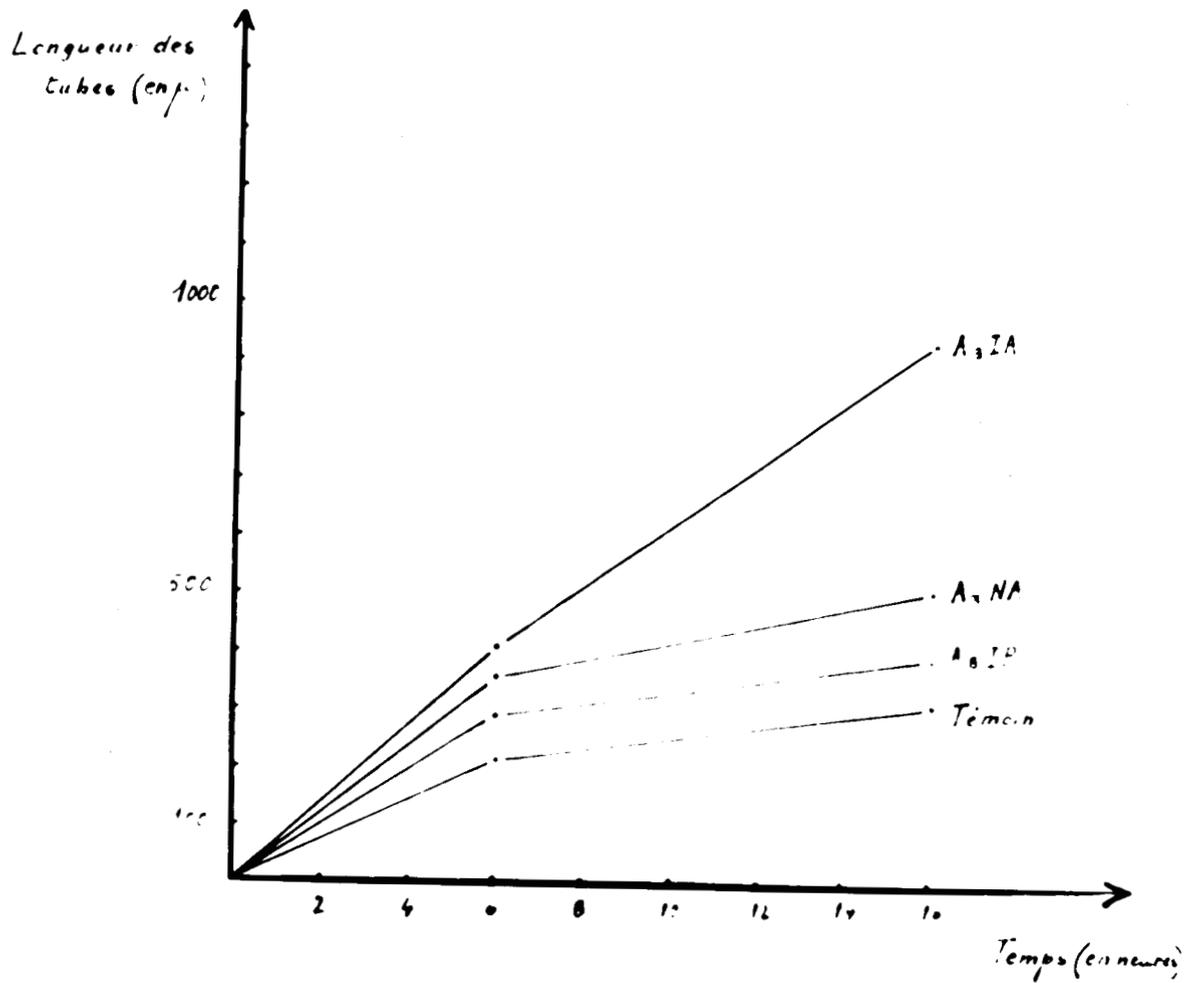
Signalons toutefois des tubes non éclatés sur milieu à lactose + A β IA, dans ce cas cytoplasme et gamètes restent enfermés dans des boursoufflures de l'intine après 48 heures de germination.

Nous observons dans certains tubes germant en présence de lactose et d'acide β indole propionique, des sortes de bouchons localisés à l'extrémité du tube et l'obligeant à bifurquer avant d'éclater. (voir photos)

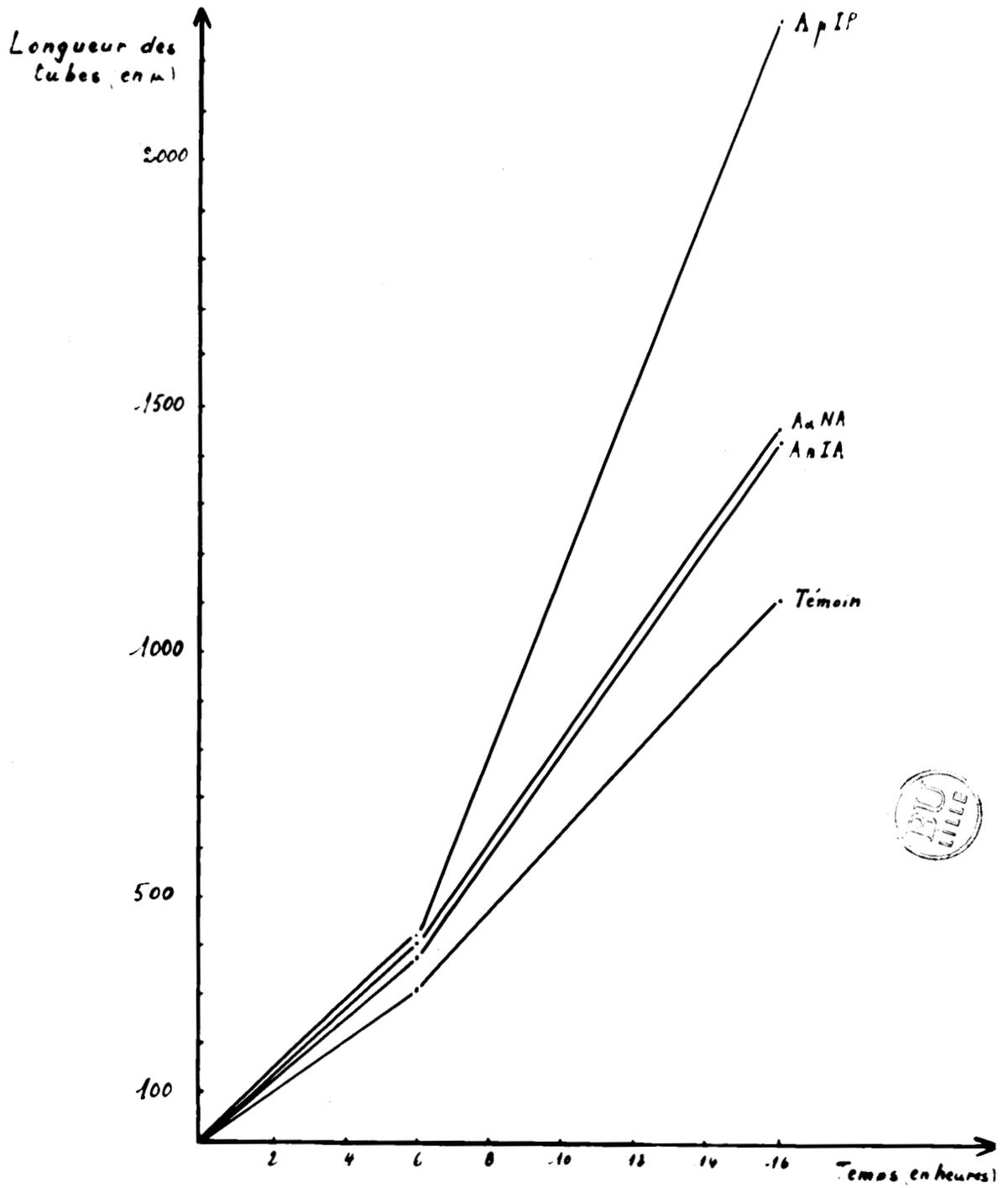
concentration en acides aminés : 5×10^{-6} g/L



concentration en acides aminés: 5×10^{-7} g/L



concentration en acides aminés: 5×10^{-8} g/L

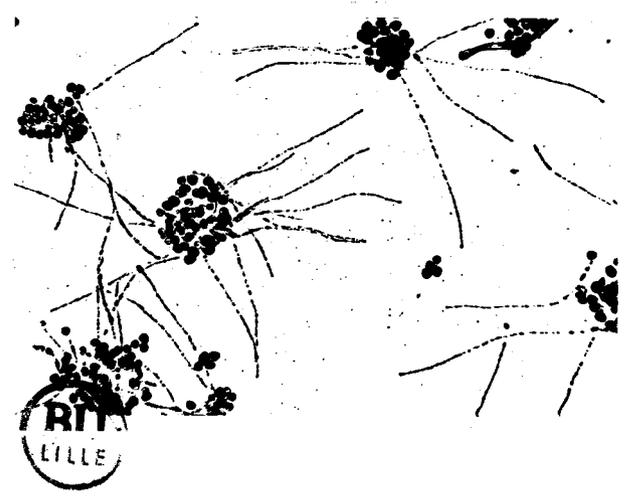


Tubes polliniques de fleurs longistyles (Gt. 90)
6h de germination.

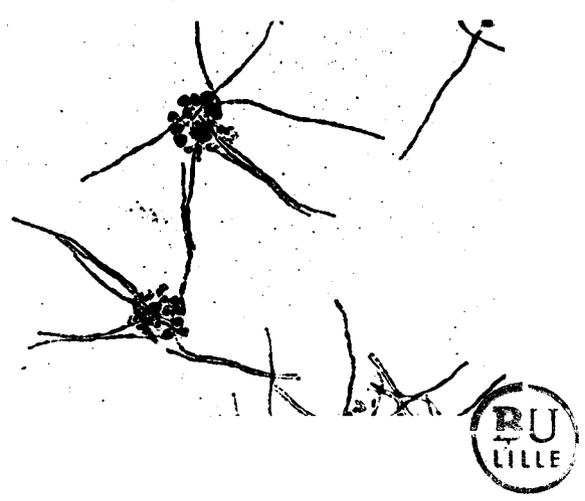
glucose



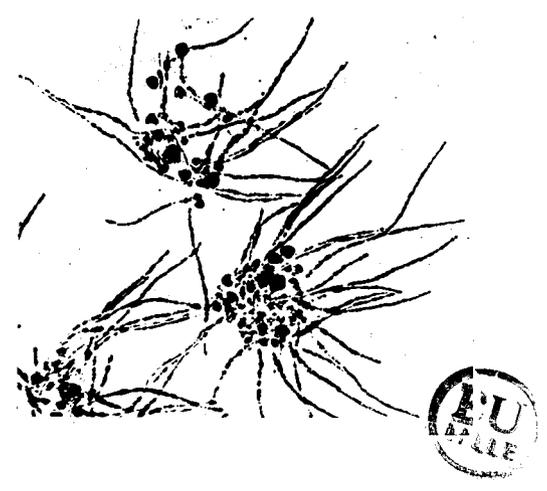
lactose



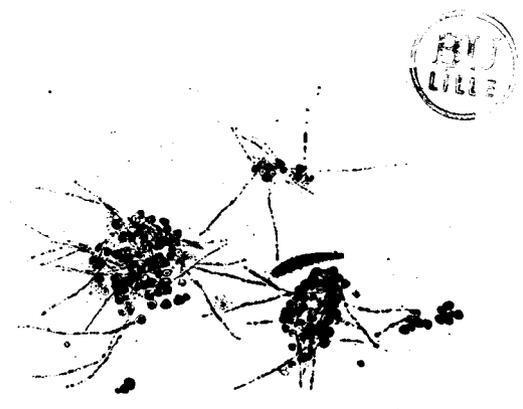
glucose + A NA



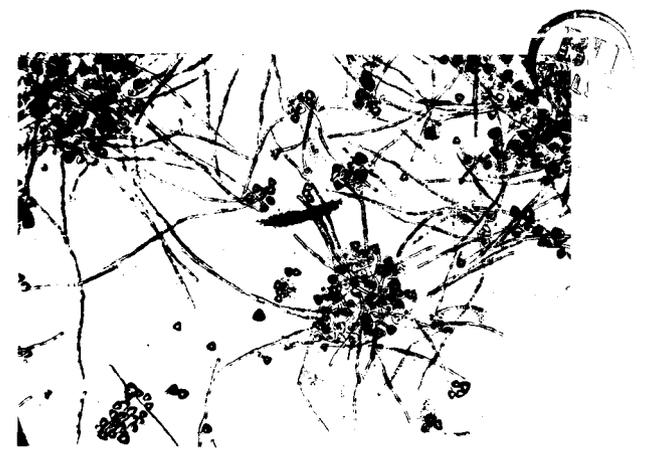
glucose + A NA



glucose + A IA



glucose + A IP



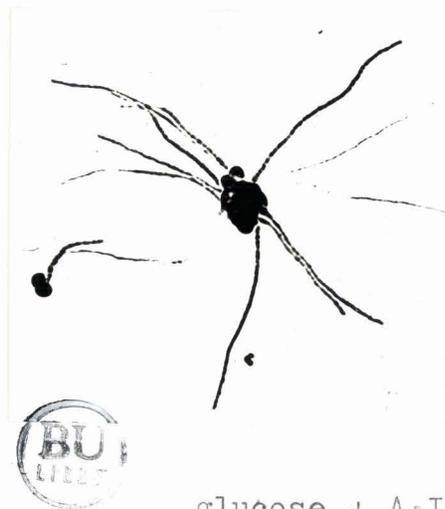
Tubes polliniques de fleurs brévistyles (Gt.90)

6h de germination

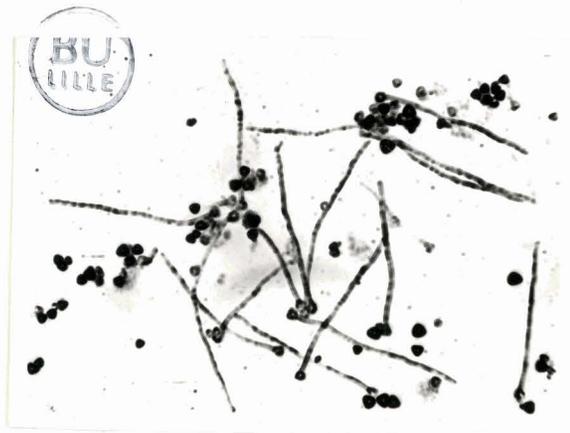
glucose



lactose

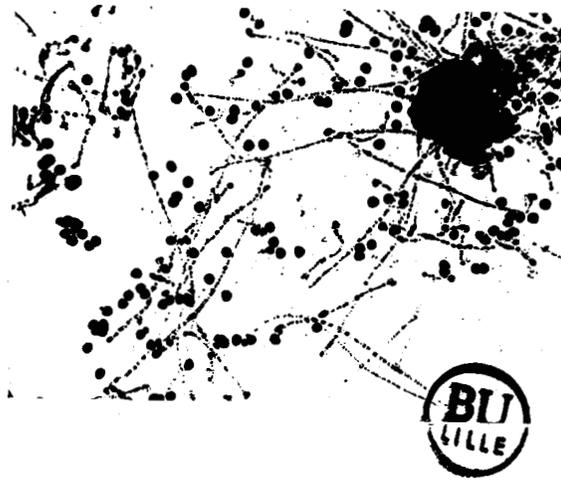


glucose + A_βIA



Tubes polliniques de fleurs longistyles (Gt. 90)

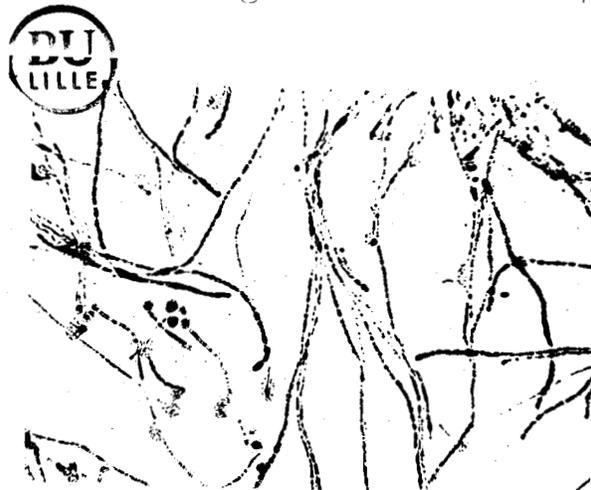
glucose 30h



lactose 30h



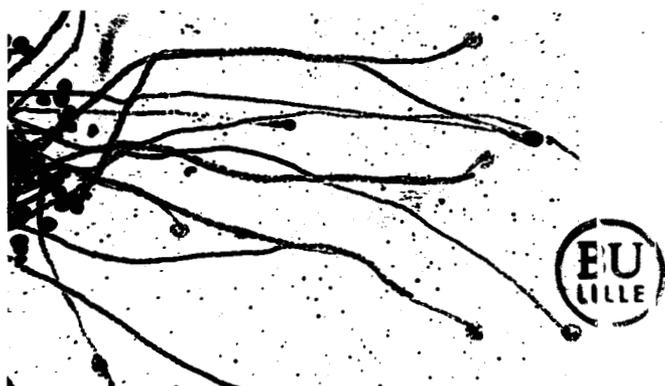
glucose + A NA 24h



Tubes polliniques de fleurs brévistyles (Gt. 90)
glucose 28h



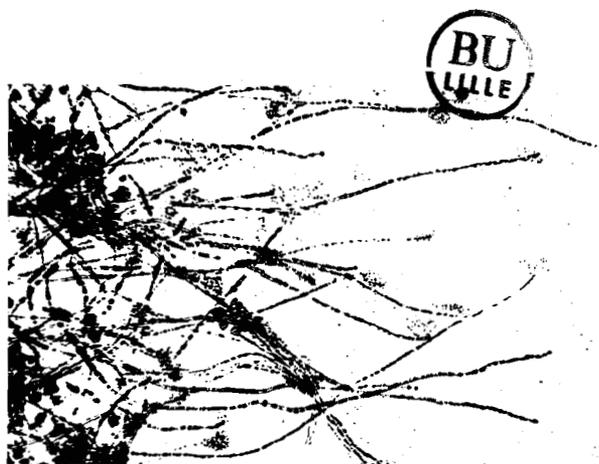
lactose 28h



lactose 48h



glucose + A:IA 28H



Tubes polliniques de fleurs longistyles(Gt. 600)

lactose + A₂IP
24h



lactose + A₂IA
48h



CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La germination in vitro des deux types de pollen de *Primula Obconica* a été étudiée sur milieu gélosé + glucose pur.

La courbe de croissance du tube pollinique de brévistyle n'est pas superposable à celle du tube de longistyle.

En début de germination, le premier présente une croissance plus rapide. En fin de germination, les deux tubes sont sensiblement d'égale longueur.

L'addition de filtrats de broyats de pistil au milieu de culture ne provoque pas d'action stimulante ou inhibitrice dans la germination.

L'acide borique en paillettes active la germination du pollen de brévistyle. Cette action est observable pendant toute la durée de la germination. L'optimum de longueur des tubes est réalisé pour une concentration en BO_3H_3 de 0,001%.

Placés sur un même milieu de culture, les deux types de pollen exercent une stimulation réciproque; celle qui provient du pollen de brévistyle est plus marquée, surtout en début de germination.

D'après les essais effectués le pH optimum du milieu de culture est voisin de 7. La recherche de ce pH est délicate car les solutions-tampons ne doivent pas contenir d'ions susceptibles d'influencer la germination.

Le sucre le plus favorable à la germination est le lactose à la concentration de 10%. Il active la croissance en début de germination et la prolonge au-delà de la 16ème heure, jusqu'à 24 ou 48 heures. En même temps la 2ème mitose pollinique est retardée.

Enfin, certains acides organiques augmentent la vitesse de croissance des tubes polliniques, tout en ne prolongeant pas la durée de la germination au-delà de 16 heures.

En conclusion, l'acide borique, le lactose et des acides organiques ont produit in vitro une stimulation de la croissance des tubes polliniques de longistyle et de brévistyle de *Primula obconica*.

---:---:---:---:---:---:---:---



- BIBLIOGRAPHIE -

COLOMBO Mariani P. 1959-60

- Analyse de l'effet du Bore sur la germination du pollen.

Atti.Mem. Accad. patav. Sci.Lettere. Arti. Partie II
T. 72 : 101 - 131.

GERSHOY Gabriel 1961

- A technic for germinating pollen of sugar maple.
J. forest. T. 59 - No 3 : 210.

GAUCH H.G., and DUGGER W.M. 1953

- The rôle of Boron in the translocation of sucrose
Plant. Physiol. T. 28 : 457 - 466.

GLENK H.O. 1960

- Keimversuche mit *Oenothera* pollen in vitro.
Flora Dtsch. 1960 T.148 No 3 : 378 - 433

HECHT A. 1960

- Growth of pollen tubes of *Oenothera organensis*
through otherwise incompatibles styles.
Amer Jour. Bot. T. 47 No 1 : 32 - 36.

JOHRI B.M. VASIL I.K. 1960

- The pollen and pollen tube
Ergbn. Biol. Dtsch. T.23 - p. 1 - 13.

KUBO 1960

- On the germination of pollen grains of *Brassica*
Napus L.
Bot. mag. jap. T.73 : 453 - 7

LABOUREUR 1960

- Interraction de l'acide gibberellique et de l'acide indole acétique dans la germination du pollen de tulipe.

GR. Acad. Sciences Fr. T;250 - No 9 : 1715 - 17

LITHARD S.

- Etude expérimentale de l'action du bore sur la germination du pollen in vitro.

D.E.S. Sciences Naturelles. Strasbourg Juillet 1961.

Loo and HWANG 1944

- Growth stimulation by manganese sulphate, I.A.A. and colchicine in pollen germination.

Amer. Jour. Bot. T.31 : 356 - 67.

NANDA BOSE 1959

- Effect of gibberellin on the growth of pollen tubes.

Nature suppl. G.B. T.184 No 20 : 1577.

O'KELLEY 1957

- Boron effects on growth, oxygen uptake and sugar absorption by germinating pollen.

Amer. Jour.Bot. T.44 : 239 - 44.

RUHLAND W. 1961

- Pollen. Pollinisation. Fertilisation.

Encyclopédia of plant physiology. Vol. ~~XIV~~. p.935 - 36

SAWADA 1960

- Recherches physiologiques et morphologiques sur le grain de pollen.

Bot. Mag. Jap. T.73 - No 864 - p. 252 - 7

SINGH S.N. 1959

- Germination of pollen grains of vitis vinifera.

Curv. Sci.India. 1959 - T.28 - NO 6 : 258.

VASIL I.K. 1960

- Pollen germination in some gramineae.
Nature G.B. T.187 : 1134-5.

VASIL I.K. 1960

- Studies on pollen germination of certain Cucurbitaceae.
Amer. Jour.Bot. - T.47 : 239 - 47.

-:-:-:-:-:-:-

Il m'est très agréable d'exprimer ici ma gratitude à Monsieur le Professeur LINDER, qui, après m'avoir fait l'honneur de me confier cette étude, en guida la réalisation avec bienveillance.

Je remercie également tous ceux qui se sont intéressés à la réalisation de ce travail, en particulier Monsieur MONTUELLE pour ses conseils pratiques et mon camarade Jean DELAY pour son précieux concours dans la partie photographique.