

INRA

Institut National de la Recherche Agronomique

**Centre Antilles-Guyane
U.R.P.V. - G.A.P.**

Station d' Amélioration des plantes
INRA Antilles-Guyane
Domaine Duclos
97170 Petit-Bourg.

UNIVERSITÉ D'ANGERS

FACULTÉ DES SCIENCES
2, BOULEVARD LAVOISIER
49045 ANGERS CEDEX

MÉMOIRE POUR L'OBTENTION DE LA M.S.T. « BIOPHYSIOLOGIE
APPLIQUÉE AUX PRODUCTIONS VÉGÉTALES »

Présenté par


LOMBARD Arnaud

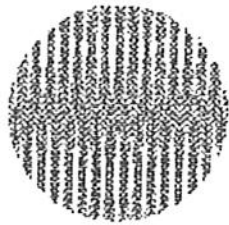
LA REPRODUCTION SEXUÉE DE L'*ALPINIA PURPURATA*.



PROMOTION : 1996-98

DATE DE SOUTENANCE : 7 MAI 1998

UNIVERSITE D'ANGERS FACULTE DES SCIENCES 2, BOULEVARD LAVOISIER 49045 ANGERS CEDEX	MAITRISE DE SCIENCES ET TECHNIQUES DE « BIOPHYSIOLOGIE APPLIQUEE AUX PRODUCTIONS VEGETALES »
Responsable Filière Biophysologie Appliquée aux productions Végétales : Monsieur VIEMONT	Date de soutenance : Jeudi 7 Mai 1998
Auteur : LOMBARD Arnaud	Organisme d'accueil : I.N.R.A., Unité de Recherche en Production Végétale Domaine Duclos Petit Bourg 97165 POINTE-A-PITRE Tél. : 05 90 25 59 40
Promotion : 1996-1998	Maître de stage : M ^{me} PETRO Dalila
Titre : La reproduction sexuée chez l' <i>Alpinia purpurata</i> .	Mots clefs : <i>Alpinia</i> , diversification, reproduction sexuée, incompatibilité.
Résumé : L' <i>Alpinia</i> est une plante ornementale cultivée en Guadeloupe. Face à la concurrence grandissante des pays en voie de développement, l'INRA-CRAAG s'est donc penché sur le problème de la diversification variétale. Cette plante a une reproduction de type végétatif stricte, or l'hybridation sexuée est une étape nécessaire à la diversification. Cette étude a consisté à caractériser les différentes barrières s'opposant à l'hybridation ; et donc à étudier les différents organes reproducteurs de l' <i>Alpinia</i> . Cette plante présente des ovules anatropes, crassinucellés avec des appendices caractéristiques des <i>Zingiberacées</i> (aruncule, épistase, hypostase, absence de cellules antipodiales.). Les ovules et le pollen semblent opérationnels, cependant une association d'incompatibilités gamétophytiques, dans les tissus du style et au niveau des micropyles des ovules, semble s'opposer à la fécondation. D'autre part une incompatibilité postzygotique s'associant à ces dernières n'est pas exclue et devra être confirmée. L' <i>Alpinia purpurata</i> est donc une plante qui devra encore être étudiée à l'aide de nouvelles techniques pour caractériser toutes les barrières s'opposant à l'hybridation sexuée, et donc espérer pouvoir les contourner.	
Abstract : <i>Alpinia purpurata</i> is an ornamental plant, which is widely cultivated in the West Indies. Against the growing ferocious competition from the third world, INRA located in the West Indies has become involved with this problem with a view to inbreeding the <i>Alpinia</i> using sexual hybridisation. Nevertheless <i>Alpinia</i> is strictly reproduced vegetatively, so a method needs to be found to overcome sexual reproduction barriers. This study is an investigation of the reproductive organs of the <i>Alpinia</i> . The ova are crassinucelated with the characteristic appendages of <i>Zingiberaceae</i> (aruncle, epistase, hypostase, antipodial cells absent). The ova and pollen seem to be functional, however an association of gametophytic incompatibilities in the style and at the level of micropyle of the ovum seem to prevent fecondation. What is more, a postzygotic incompatibility can't be discounted, and needs to be confirmed. <i>Alpinia purpurata</i> is a plant, which will have to be studied with other techniques in order to discover all the barriers involved in its sexual incompatibility, whereby we can bypass these barriers.	
Je soussigné(e) Madame PETRO Dalila, Maître de stage de l'établissement dans lequel M. LOMBARD Arnaud a effectué son stage,	
<p style="text-align: center;"> AUTORISE N'AUTORISE PAS LA PUBLICATION DES SOURCES BIBLIOGRAPHIQUES, DES RESUMES FRANCAIS, ANGLAIS. </p> <p style="text-align: center;"> AUTORISE N'AUTORISE PAS LE DEPOT DU MEMOIRE DANS UNE BIBLIOTHEQUE. </p> <p> Date : 27/04/98 Signature du Maître de stage :  </p>	



INRA

Institut National de la Recherche Agronomique

**Centre Antilles-Guyane
U.R.P.V. - G.A.P.**

Station d' Amélioration des plantes
INRA Antilles-Guyane
Domaine Duclos
97170 Petit-Bourg.

UNIVERSITÉ D'ANGERS

FACULTÉ DES SCIENCES
2, BOULEVARD LAVOISIER
49045 ANGERS CEDEX

MÉMOIRE POUR L'OBTENTION DE LA M.S.T. « BIOPHYSIOLOGIE
APPLIQUÉE AUX PRODUCTIONS VÉGÉTALES »

Présenté par

LOMBARD Arnaud

LA REPRODUCTION SEXUÉE DE L'*ALPINIA PURPURATA*.

INFLORESCENCE D'*ALPINIA PURPURATA*

VARIÉTÉ ROUGE

PROMOTION : 1996-98

DATE DE SOUTENANCE : 7 MAI 1998

Remerciements

Je tiens à remercier une foule de personnes qui mises bout à bout ont fait de ce stage une expérience inoubliable.

Tout d'abord, merci à ma famille, mes parents et Alexandra qui m'ont apporté leur soutien et leur bonne humeur avec quelques surprises en prime... (n'est-ce pas ?).

M^{lle} Pétero, vous avez toujours été présente quand j'avais besoin de vous, mon rapport ne saurait être ce qu'il est sans votre aide. Vous êtes un maître de stage hors normes. Je vous souhaite de réussir dans le programme *Alpinia*. Merci pour tout !

Je remercie M. Ano de m'avoir accueilli avec tant de gentillesse au sein de l'U.R.P.V., son aide m'a été des plus précieuses, et ses encouragements ont, je le pense, porté leurs fruits. Ce ne serait pas trop dire que c'est la première fois que je rencontre une personne avec le cœur sur la main.

M^{me} Leduc et M. Chesnel, vous vous êtes occupés de mon rapport, vos précieux conseils m'ont beaucoup aidé.

M. et M^{me} Anaïs pour leur accueil et leur gentillesse.

M. Prior, je retiendrai de vous votre sourire inébranlable, même lorsque les heures d'organisation du symposium s'accumulent sur vos épaules.

M. Moleon pour son amitié et son aide en cas de coup dur...

Nathalie pour sa gentillesse et ses renseignements.

M. Fournet, pour vos conseils en botanique.

Une pensée à tous les stagiaires et VAT que je n'ai pas cité faute de place mais que je n'oublie pas.

Et bien sûr je n'oublierai pas mes amis, qui comme moi étaient en stage, que j'ai appris à connaître en anglais et en français. Des amis avec qui il est bien plus facile de vivre loin de ses proches et avec qui la vie est bien plus palpitante.... Rendez-vous cet été en Finlande Mika, Hakim, David et François.

Que toutes ces personnes soient très très chaleureusement remerciées, je ne vous oublierai jamais !

Résumé :

L'*Alpinia* est une plante ornementale cultivée en Guadeloupe. Face à la concurrence grandissante des pays en voie de développement, l'INRA-CRAAG s'est donc penché sur le problème de la diversification variétale.

Cette plante a une reproduction de type végétatif stricte, or l'hybridation sexuée est une étape nécessaire à la diversification. Cette étude a consisté à caractériser les différentes barrières s'opposant à l'hybridation ; et donc à étudier les différents organes reproducteurs de l'*Alpinia*.

Cette plante présente des ovules anatropes, crassinucellés avec des appendices caractéristiques des *Zingiberaceae* (aroncule, épistase, hypostase, absence de cellules antipodiales.).

Les ovules et le pollen semblent opérationnels, cependant une association d'incompatibilités gamétophytiques, dans les tissus du style et au niveau des micropyles des ovules, semble s'opposer à la fécondation.

D'autre part une incompatibilité postzygotique s'associant à ces dernières n'est pas exclue et devra être confirmée.

L'*Alpinia purpurata* est donc une plante qui devra encore être étudiée à l'aide de nouvelles techniques pour caractériser toutes les barrières s'opposant à l'hybridation sexuée, et donc espérer pouvoir les contourner.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION page

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I LA CLASSIFICATION DES ZINGIBERALES.

1 <i>Ordre des Zingiberales.</i>	1
2 <i>Famille des Zingiberaceae.</i>	1
1 Morphologie des <i>Zingiberaceae.</i>	1
2 Les <i>Zingiberaceae</i> et leur intérêt économique.	1
3 <i>L'Alpinia.</i>	2
1 La classification et sa complexité.	2
2 La morphologie des principales espèces.	3

II LES ORGANES SEXUELS ET LA REPRODUCTION DE L'ALPINIA.

1 Introduction.	5
2 Le pollen.	5
1 Structures.	5
2 Germination.	6
3 Croissance des tubes polliniques dans le gynécée.	6
3 Ovules et sac embryonnaire.	7
1 Ontogenèse de l'ovule.	7
2 Structures de l'ovule et du sac embryonnaire mature.	8
3 Maturation du sac embryonnaire.	9
4 La pollinisation et fécondation.	9
1 La pollinisation autogame et allogame.	10
2 Développement des tubes polliniques et comportement des ovules.	10
3 Fécondation.	12
5 Les phénomènes de compatibilité et d'incompatibilité.	13
1 Quelques définitions.	13

2 Les différents lieux où s'expriment les incompatibilités.	14
3 Effets des phénomènes de compatibilité et d'incompatibilité sur la morphologie des tubes polliniques.	15
4 Les chromosomes et l'incompatibilité.	16
6 Les techniques d'observation.	18
1 Germination <i>in vitro</i> .	18
2 La microscopie à épifluorescence.	19
3 La microscopie à Contraste Interférentiel différentiel de Nomarski.	20

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I MATERIEL VEGETAL.	21
II METHODES.	21
1 Test de viabilité d'Alexander.	21
2 Germination <i>in vitro</i> .	21
3 La germination et croissance des t.p. <i>in situ</i> – Viabilité des ovules.	22
4 Observations des sacs embryonnaires grâce au contraste interférentiel différentiel.	23
5 Comptage de chromosomes.	23

RÉSULTATS

I RÉSULTATS DE LA PREMIÈRE ÉTUDE (TEST D'ALEXANDER ET GERMINATION <i>IN VITRO</i>).	25
II RÉSULTATS DE LA SECONDE ÉTUDE (OBSERVATIONS EFFECTUÉES SOUS FLUORESCENCE).	25
1 Fleurs longistyles et brévistyles.	26
2 Viabilité des ovules.	27
3 Généralités sur les croisements autogames.	27
1 Caractéristiques de tous les croisements R x R effectués.	27
2 Problèmes posés par « l'Obturateur ».	27
4 Croisements R x R, R x r, R x S.	28
5 Croisements R ₁ x R ₁ , R ₁ x R ₂ , R ₁ x R ₃ .	29
6 Croisements R ₁₁ x R ₁₂ , R ₂₁ x R ₂₂ , R ₃₁ x R ₃₂ .	29

III OBSERVATION DES SACS EMBRYONNAIRES GRACE AU CONTRASTE INTERFERENTIEL.	30
1 description morphologique des ovules d' <i>Alpinia purpurata</i> .	30
1 Développement dans les boutons.	30
2 description de l'ovule mature réceptif.	32
3 Sénescence des ovules non pollinisés.	32
4 Evolution des ovules après pollinisation.	33
2 Résultats des Influences des différents croisements sur les ovules.	36
IV COMPTAGE CHROMOSOMIQUE.	38

DISCUSSION

I INTRODUCTION : MORPHOLOGIE DE L'ALPINIA PURPURATA.	39
II DISCUTONS LA VIABILITE, LA GERMINATION DU POLLEN ET LES TECHNIQUES D'OBSERVATIONS.	39
III OBSERVATION DE LA VIABILITE DES OVULES A L'AIDE DE LA FLUORESCENCE.	40
IV ETUDE DE LA PROGRESSION DES TUBES POLLINIQUES SELON LES CROISEMENTS.	40
1 Croisements intraspécifiques $R_1 \times R_1, R_1 \times R_2, R_1 \times R_3$.	40
2 Comparaison des croisements intra et interspécifiques $R \times r, R \times S$.	41
3 L'obturateur.	42
4 Conclusion.	43
V DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS AVEC LES OBSERVATIONS EN CONTRASTE INTERFERENTIEL DIFFERENTIEL.	44
1 Morphologie et développement des ovules d' <i>Alpinia purpurata</i> .	44
2 Influence des différents croisements sur les ovules.	45
3 Conclusion.	47
VI COMPTAGE CHROMOSOMIQUE.	47

CONCLUSION

INTRODUCTION

2. L'hybridation sexuée : En Guadeloupe l'*Alpinia* est une plante à multiplication végétative stricte. Malgré la présence de fleurs, il n'y a pas de production de fruits naturellement et la plante reste récalcitrante à l'hybridation sexuée. Il est toutefois possible d'obtenir des fruits avec un taux de nouaison faible en pollinisant artificiellement les fleurs.

Les variants obtenus par les méthodes de biotechnologie décrits, ou par hybridation sexuée seront alors utilisés comme « géniteurs » afin d'introduire et d'associer des gènes à caractères phénotypiques économiquement intéressants dans une même plante. Le but de notre travail a été d'étudier les organes reproducteurs de l'*Alpinia purpurata*, ainsi que les diverses étapes menant à la fécondation des ovules, afin d'optimiser l'obtention de nouveaux variants par hybridation sexuée.

Des études ont déjà été menées pour étudier la durée de vie de la fleur, la réceptivité du stigmate, le milieu optimal à la germination du pollen *in vitro*... ; cette étude permettra donc de connaître et de caractériser :

- ✓ La capacité germinative du pollen (techniques d'Alexander et de germination *in vitro*) et la progression des tubes polliniques dans le pistil (technique de germination *in situ*).
- ✓ La viabilité des ovules (technique de germination *in situ*).
- ✓ La formation des ovules et leur morphologie (absence de barrière physique interdisant l'accès au micropyle des tubes polliniques...). La présence ainsi que la viabilité des différents noyaux du sac embryonnaire et leur évolution en fonction de différents croisements sera observée (Microscopie à contraste interférentiel différentiel).
- ✓ Comptage chromosomique sur pointes de racines pour savoir s'il y a concordance entre les différentes espèces d'*Alpinia* (Technique de Feulgen).

Ces différentes observations ont donc pour but de découvrir l'origine de la barrière s'opposant à l'hybridation sexuée de l'*Alpinia*. Une solution pour contourner cette barrière et donc d'obtenir un taux de nouaison plus important après pollinisation sera alors peut-être envisageable. L'hybridation sexuée pourrait alors devenir un outils de plus dans l'élargissement de la variabilité dans les coloris de l'*Alpinia purpurata*.

Dans le présent mémoire après un rappel de la biologie florale de l'*Alpinia*, des étapes de germination du pollen et de la structure du sac embryonnaire ainsi que leurs moyens d'étude nous présenterons et discuterons nos résultats.

L'agriculture est la base de l'économie guadeloupéenne et constitue la seule possibilité réelle de développement d'une économie de production.

La canne à sucre et la banane occupent encore une place importante dans le paysage agricole : 166.000 Hectares pour la canne, 7.055 ha pour la banane, en 1991 (Vennat & al, 1995) ; mais l'importance économique des deux monocultures n'est pas en rapport direct avec la place qu'elles occupent sur le terrain (Anais, 1982).

La production végétale totale est en phase de régression. En effet alors que la production végétale totale représentait 937,2 millions de Francs en 1993, elle ne s'élève plus qu'à 917,9 millions de Francs en 1994. Cependant la production florale reste un atout essentiel dans le cadre de la diversification de l'agriculture (de 49 à 55,9 millions de Francs entre 1993 et 94) (Vennat & al, 1995). Cette production à forte valeur ajoutée est susceptible de générer un nombre important d'emplois et son développement peut accompagner celui du tourisme.

La production florale comprend la culture de :

- Plantes ornementales (653 kg exportées en 1996)
- Fleurs coupées (20,559 tonnes exportées en 1996).

L'*Alpinia* (*Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum.) est la deuxième fleur coupée cultivée en Guadeloupe et en Martinique après l'*Anthurium*. C'est la première fleur exportée vers l'Europe et les Etats-Unis : 300.000 fleurs exportées en 1994 contre 200.000 fleurs pour l'*Anthurium* (Vennat & al, 1995). Cultivée pour ses « fleurs » rouges ou roses très appréciées, la culture de cette plante s'est développée suite aux problèmes posés par la galle bactérienne de l'*Anthurium* (bactériose provoquée par *Xanthomonas*).

L'*Alpinia* semble élu pour ses atouts tels que l'espérance de longévité de la fleur (5 semaines), sa disponibilité (en toute saison), sa multiplication rapide, sa tolérance vis à vis des substrats. Enfin son transport est facile et sans aucun dommage, c'est pourquoi on peut rencontrer des sociétés dont le principal atout est la vente de ces fleurs par correspondance (colis).

Cependant, les producteurs doivent faire face à une concurrence farouche venant des pays en voie de développement (Costa-rica, Colombie, Vénézuéla, Thaïlande). En effet ces derniers bénéficient d'une main d'œuvre bon marché, de grandes surfaces de culture et de moyens de transport maintenant bien développés, ce qui leur permet d'inonder le marché avec une fleur de bonne qualité. C'est donc dans un souci de diversification variétale et d'adaptation aux souhaits des producteurs, que l'I.N.R.A. de Guadeloupe travaille sur l'amélioration de l'*Alpinia* pour la création de variétés de coloris diversifiés. C'est aussi le seul laboratoire de recherche s'intéressant au problème de diversification variétale de l'*Alpinia*, le programme est quasiment vierge et la bibliographie traitant de l'*Alpinia* reste peu abondante.

Deux méthodes sont utilisées pour y parvenir :

1. Les biotechnologies :

- ◆ La mutagenèse. Des vitroplants ont été irradiés par des rayons gamma, les descendants sont en cours d'étude.
- ◆ La callogenèse. Le milieu de culture et le type d'explants nécessaires pour la formation de cals et leur régénération a été mis au point. Les régénérants sont en cours de culture.

Tableau I - Caractéristiques principales des Zingiberales

Caractéristiques	Aux foliaires	Feuilles	Inflorescence	Gynécée	Quaines	Divers
Caractéristiques	Les organes à air sur les foliaires sont organisés par des structures régulières	Les foliaires sont complètement lisses	Les inflorescences sont terminales ou latérales	Le gynécée est composé de deux ovaires par carpelle	Les quaines sont composées de deux ovaires par carpelle	Les ovules de divers ordres sont inclus dans les ovaires
	Les organes à air sur les foliaires sont organisés par des structures régulières	Les foliaires sont complètement lisses	Les inflorescences sont terminales ou latérales	Le gynécée est composé de deux ovaires par carpelle	Les quaines sont composées de deux ovaires par carpelle	Les ovules de divers ordres sont inclus dans les ovaires

(Kress, 1990)

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau II - Caractéristiques principales des Zingiberales

Caractéristiques	Plants	Feuilles	Inflorescence	Fleurs	Androcée	Gynécée	Divers
Caractéristiques	Les plantes sont herbacées ou ligneuses	Les foliaires sont complètement lisses	Les inflorescences sont terminales ou latérales	Les fleurs sont régulières	Les androcées sont composées de deux étamines par étamine	Le gynécée est composé de deux ovaires par carpelle	Les ovules de divers ordres sont inclus dans les ovaires
	Les plantes sont herbacées ou ligneuses	Les foliaires sont complètement lisses	Les inflorescences sont terminales ou latérales	Les fleurs sont régulières	Les androcées sont composées de deux étamines par étamine	Le gynécée est composé de deux ovaires par carpelle	Les ovules de divers ordres sont inclus dans les ovaires

Tableau I.- Caractéristiques principales des Zingiberales.

	Axe foliaire	Feuilles	Inflorescence	Gynécée	Graines	Divers
Caractéristiques	Les canaux à air sur l'axe foliaire sont segmentés par des diaphragmes transversaux contenant des cellules étoilées. L'axe foliaire ne compte qu'un seul large paquet de tissus vasculaires et un système subsidiaire de petits vaisseaux	Feuilles ligulées. Le limbe est entier avec des veines latérales divergentes à partir d'une nervure commune. La moitié du limbe recouvre complètement l'autre lors de son développement. L'hypoderme est formé de cellules incolores	L'inflorescence est terminale ou latérale généralement généralement composée de fleurs zygomorphes à calice et corolle séparés.	Le gynécée est syncarpe, tricarpellé, triloculaire à ovaires infères avec un à n ovules par carpelle.	Les graines contiennent à maturité, du périsperme et sont operculées avec un col micropylaire et souvent arillées (Grootjen et Bouman, 1981).	Les cellules de gardes sont entourées de deux petites cellules subsidiaires parallèles au pore. Il y a présence de cellules à corps siliceux (<i>stigmata</i>) associées avec les tissus vasculaires dans toutes les parties de la plante sauf dans les racines. Les poils absorbants sont généralement unicellulaires.

(Kress, 1990).

Tableau II.- Caractéristiques principales des Zingiberaceae.

	Plante	Feuilles	Inflorescence	Fleurs	Androcée	Gynécée	Divers
Caractéristiques	Grande herbe pérenne (deux à trois mètres de haut) rhizomateuse et aromatique (Theobald et Lucas, 1982).	Les feuilles sont caulinaires et distiques ou basales avec des gaines foliaires fendues. Limbe à nervation pennée (Theobald et Lucas, 1982).	Inflorescence en épis ou panicules solitaires courts ou longs, lâches ou compacts, à l'apex d'un scape basal sans feuilles ou à l'extrémité de tiges feuillues. Bractées presque toujours présentes, souvent colorées. Bractéoles souvent présentes (Theobald et Lucas, 1982).	Fleurs irrégulières, parfaites. Ces fleurs ont une organisation trimère : trois pétales, trois sépales, (Theobald et Lucas, 1982). La pollinisation est Entomophile ou Omithophile. Présence de nectaires floraux. Calice tubuleux ou spathacé, souvent trilobé. Corolle infundibuliforme, trilobée. Labelle souvent grand, bi-trilobé (Watson et Dallwitz, 1992).	Deux verticilles de trois étamines transformées en quatre étamines stériles souvent pétaloïdes dentiformes ou nuls, une étamine fertile et une étamine avortée (Theobald et Lucas, 1982). Filet court ou long ; anthères appendiculées ou non, biloculaire, à loges longitudinalement déhiscentes. Microsporogénèse successive; la microspore initiale est généralement une tétrade isobilatérale ou tétraédrique ou en forme de T ou encore linéaire (Watson et Dallwitz, 1992).	Pas de disque hypogyne. Style filiforme. Stigmate infundibuliforme, souvent cilié à l'apex. Ovaire infère, en général triloculaire. Fruit capsulaire, souvent plus ou moins charnu (Fourmet, communications personnelles). Albumen à formation hélobial (Watson et Dallwitz, 1992).	Le nectar est sécrété par les glandes spécialisées du gynécée se situant à la base du gynécée ou encore à partir des staminodes. Les graines sont amidonnées. Un seul cotylédon et il est non assimilateur. Embryon droit et sans chlorophylle. Hypocotyle présent. Mésocotyle absent. Première feuille dorsi - ventrale. Racine primaire éphémère (Watson et Dallwitz, 1992).

I CLASSIFICATION DES ZINGIBERALES.

I-1 Ordre des Zingiberales.

L'ordre des *Zingiberales* appartient à la classe des Monocotylédones et au super ordre des *Zingiberiflorae*. Ce super ordre se caractérise par des cellules pilifères racinaires plus courtes que les cellules épidermiques, des tubes criblés contenant de l'amidon, la présence de cellules à corps siliceux (*stigmata*). Les fleurs sont épigynes. Le manque d'ouvertures distinctives sur les grains de pollen est caractéristique (Kress, 1990).

L'histoire de sa classification a été longue, elle a débuté en 1883 avec Bentham et Hooker et d'autres changements dans l'ordre des *Zingiberales* ne sont pas exclus.

Suite à son étude en 1990 sur la phylogénie de cet ordre, Kress propose le « Rhizogram » des *Zingiberales* (Figure 1 annexe 1).

Le plus vieil ancêtre découvert appartiendrait au genre *Zingiberopsis* datant du Crétacé, mais la plupart des fossiles de *Zingiberales* sont découverts dans des dépôts de l'Eocène. Cet ordre se caractérise par les traits morphologiques décrits dans le tableau I.

I-2 Famille des Zingiberaceae.

I-2-1 Morphologie des Zingiberaceae.

La famille des *Zingiberaceae* (dite aussi Ginger) compte environ 50 genres et plus de 1.000 espèces d'après Theobald et Lucas (1982). Ce Taxon est différencié des autres par les particularités résumées dans le tableau II.

Cette famille comprend de nombreuses espèces utilisées pour la fabrication d'épices et de médecines : le safran (*Curcuma spp.*), la cardamome (*Elettaria cardamomum*), le gingembre (*Zingiber officinale*), graines de paradis (*Aframomum melegueta*), une épice utilisée en Europe au moyen - âge : le galangal (*Alpinia officinarum*) (Theobald et Lucas, 1982).

I-2-2 Les Zingiberaceae et leur intérêt économique.

La très grande diversité des *Zingibéracées*, leurs qualités thérapeutiques, leur culture en tant que plante ornementale, leur utilité dans l'industrie des épices confèrent à cette famille de très grands atouts qui permettent de comprendre quel peut être l'intérêt de l'homme à mieux connaître cette famille ubiquiste (annexe 2).

Tableau III.- Caractéristiques principales du genre *Alpinia*.

	Plante	Inflorescence	Fleur	Androcée	Fruit
Caractéristiques	Herbe rhizomateuse à tiges feuillées bien développées avec de petites ligules.	Leurs inflorescences thyrsoides ou racémeuses, terminales se situent sur des tiges feuillées. Les bractées sont nulles ou petites, rarement grandes et les bractéoles ont diverses formes.	La fleur est solitaire ou en groupes de 2 à plusieurs. Le calice tubulaire à turbiné, brièvement trilobé mesure en général la même taille que le tube de la corolle. Le labelle, petit ou grand, est muni de deux très petits staminodes à la base.	Le filet staminal, de taille variable, est souvent plus long que l'anthere ; connectif se muni ou non d'un très petit appendice apical.	Placentation pariétale à basale pour les genres uniloculaires et axiles pour les triloculaires. Les Capsules sont de formes variées.

(Fournet, communications personnelles)

I-3 Le genre *Alpinia*.

Différentes espèces de la famille des Gingers sont connues pour leur magnifique fleur parfumée et leur feuillage surprenant. Parmi ceux-ci se situent les Ginger lilies qui regroupent les espèces des genres *Hedychium* et *Alpinia*. Le genre *Alpinia* contient environ 250 espèces (Steffey, 1986) dont 200 espèces endémiques largement réparties à travers l'Indo-Malaisie et le sud-est de l'Asie jusqu'au Queensland, on le trouve encore en Chine, au Japon et au Sri Lanka (Burt et Smith, 1990). Les exportations ont permis une plus grande répartition du genre surtout dans les tropiques. Ce genre est représenté par des plantes dont les caractéristiques morphologiques sont décrites dans le tableau III.

I-3-1 La classification et sa complexité.

Des études récentes, incluant celles de Burt et Smith en 1990, ont eu pour but d'éclaircir les énormes difficultés de nomenclature et de caractérisation de la famille des *Zingiberaceae*. La famille est vaste et encore mal connue, ainsi la classification tendra à se préciser dans le futur comme on le verra ci-après.

Alpinia zerumbet (Pres.) Burt & Smith. est une plante qui peut être dénommée avec plusieurs synonymes : *Costus zerumbet* Pres, *Alpinia mutans* (Rosc.), *Alpinia speciosa* (Wendl.), *Zerumbet speciosum* (Wendl.), *Languas speciosa* (Wendl.), *Catimbium speciosum* (Wendl., Holtt.) selon Fournet, communications personnelles)

La taxonomie est en constant remaniement dans le règne végétal, entraînant par la même des sources de confusions importantes. En général le nom d'espèce sert de repère car une plante qui passe d'un genre à un autre lors de remaniements taxonomiques, garde son nom d'espèce (*Alpinia zerumbet* synonyme de *Costus zerumbet*), mais ce nom d'espèce peut être utilisé comme nom de genre pour décrire la même plante (*A. zerumbet* synonyme de *Zerumbet speciosum*). Le nom d'espèce peut encore être utilisé dans un autre genre pour désigner deux plantes différentes. Exemple : *Curcuma zerumbet* et *Alpinia zerumbet*.

De même les noms vernaculaires peuvent être source de confusion :

Red Ginger plante décrite par Dick, en 1992, est commune en forêt tropicale où l'humidité est suffisante et la lumière raisonnable. Les fruits sont des capsules de la taille des dernières phalanges d'un doigt et contenant une masse de graines brunes comestibles. Mais il s'agit en fait de *Hornstedtia scottianna* et non pas de *Alpinia purpurata* (dit aussi Red ginger).

Ainsi le nom d'espèce d'une plante, ou bien son nom vernaculaire, peut tout aussi bien servir pour la reconnaître, qu'il peut induire en erreur. C'est pourquoi il est toujours préférable de se référer à une flore récente pour avoir une description complète de la plante en question et pour avoir les différents synonymes qui la dénomment.

La découverte continuelle de nouvelles espèces d'Australie ou même d'Inde tels que : *Alpinia hylandii*, *Amomum queenslandicum* et *Achasma australasicum* décrites par Smith (1980), ou encore *Alpinia smithiae* découvert en 1991 par Sabu et Mangaly, indique que le genre est encore assez mal connu et que des progrès sont encore à faire. Ainsi donc la classification est en remaniement et les mouvements de classification encore à l'ordre du jour (Smith, 1990). Ceci permet la création de nouveaux genres, mais en bouleversant alors le nom scientifique de plantes déjà décrites. Nous pouvons prendre l'exemple de l'adoption récente du genre *Pleuranthodium* remplaçant alors des *Alpinia* (*Alpinia platynema*, *A. roemeri*...), mais aussi des *Riedelia* (*Riedelia piundaundensis*) (Smith, 1991).

Feuilles vertes (distiques, oblongues) de 30 à 70 cm sur 6 à 15 cm

- Inflorescence érigée. Labelle Blanc

A. purpurata

- Inflorescence pendante. Bractée absente. Labelle jaune à bandes rouges et brunes

A. zerumbet

Feuilles à bandes et/ou rayures blanches ou ivoire

- Feuille de plus de 15 cm. Inflorescence penchée de 15 cm. Bractées vertes teintées de rose

A. vittata

- Feuille de 30 à 70 cm. Inflorescence de 40 cm pendante. Absence de bractées

A. zerumbet

Fig. 2.-Classification des quatre principales espèces d'*Alpinia* selon Fournet (communications personnelles).

Règne : Végétal

Phylum : Angiospermes

Classe : *Monocotyledonae*

Super Ordre : *Zingiberiflorae* (Dahlgren, Clifford et Yeo.) W.J. Kress.

Ordre : *Zingiberales* (Nakai.) W.J. Kress.

Sous Ordre : *Zingiberineae* (W.J. Kress.)

Super famille : *Zingiberareae* (W.J. Kress.)

Famille : *Zingiberaceae* (Lindley.) W.J. Kress.

Sous famille : *Zingiberoideae* (R.M. Smith.)

Tribu : *Alpineae* (R.M. Smith.)

Genre : *Alpinia* (Vieill.) K. Schum.

Sous genre : *Alpinia* (R.M. Smith.)

Section : *Guillainia* (Vieill.) R.M. Smith.

Espèce : *purpurata* (Vieill.) K. Schum.

Fig. 3.- La classification de l'*Alpinia purpurata*.

Malgré ces remaniements récents de nouvelles ambiguïtés subsistent. En effet Smith décrit en 1992 l'espèce *Pleuranthodium* et la différencie de l'espèce *Alpinia* par leurs fruits respectifs. Le genre *Pleuranthodium* produirait des fruits rouges et déhiscent à la base en trois parties égales ; le genre *Alpinia*, lui, formerait des fruits ronds, bleus ou ovoïdes et grisâtres pourpre - brun, qui ne sont jamais déhiscent. Or les fruits d'*Alpinia purpurata* observés sont ovoïdes, roses ou rouges et déhiscent à la base (Photographie 1, annexe 3), ce qui relèguerait l'*Alpinia purpurata* au genre : *Pleuranthodium purpurata* ?

La classification qui sera retenue pour les principales espèces d'*Alpinia* est présentée fig. 2.

I-3-2 Morphologie des principales espèces.

I-3-2-a *A. vittata* Bull. (= *A. sanderae*)

La plante peut atteindre une hauteur de 1,5 m. Les feuilles mesurent 15 cm, sont lancéolées et vertes à bandes blanches ou crème. L'inflorescence de 15 cm est penchée. Les bractées persistantes sont vertes teintées de rose et peuvent compter 2 à 5 fleurs chacune. La corolle est vert pâle à lèvres charnues plutôt que pétales (Fournet., communications personnelles).

I-3-2-b *A. zerumbet* (Pers.) Burtt et Smith. (= *Costus zerumbet*)

L'appareil végétatif peut atteindre une hauteur de 4 m. Les feuilles mesurent 15 cm, sont lancéolées, oblongues, à marge généralement ciliée, et présentent une ligule. La ligule coriacée, de longueur de 8 à 12 mm, obtuse, est souvent densément pubescente (poils appliqués brunâtres). Le pétiole mesure généralement de 0 à 10 mm. La panicule de 40 cm est racémiforme et pendant son axe brun - rouge, duveteux ne porte pas de bractées. On peut dénombrer 2 fleurs par « bractées » soutenues par des bractéoles blanches. Ces fleurs sont odorantes, roses à rouges à l'apex et mesurent de 20 à 30 mm. Le calice de taille 15 à 18 mm, est lobé, blanc (rouge à l'apex). La corolle blanche teintée de pourpre de plus de 40 mm possède un tube plus court que le calice. Les lobes elliptiques de 25 à 30 mm, ont un aspect cartilagineux et nacré. Le labelle de 3,5 à 4 cm par 1 à 3 cm, apparaît gaufré, jaune, à bandes rouges et brunes (Photo. 2, annexe 3). Les staminodes latéraux subulés mesurent 2 mm ; l'étamine plus de 25 mm. Les fruits sont des capsules rouges et sphériques (diamètre de plus ou moins 20 mm) selon Fournet (communications personnelles).

Propriétés médicinales : Etats grippaux, Anti-ulcéreux gastriques.

I-3-2-c *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum.

A. purpurata (Vieill.) K. Schum. (= *Guillainia purpurata* Vieill., *Alpinia grandis* K.Schum.) introduit en Guadeloupe sans doute depuis 1950, cette plante se situe dans des altitudes de 0 à 800 m et fleurit toute l'année.

Nom vernaculaire : Red ginger ou lavande rouge (wouj).

La classification de l'*Alpinia purpurata* est présentée fig. 3.

Cette plante herbacée et aromatique est originaire d'Indonésie et d'Océanie.

Tableau IV.- Caractéristiques de l'appareil reproducteur de l'*Alpinia purpurata*.

	Inflorescence	Fleur	Androcée	Gynécée	Fruit
Caractéristiques	<p>Inflorescence racémeuse érigée de hauteur 15 à 25 cm et de diamètre 4 à 10 cm.</p> <p>Bractées chamues – cartilagineuses, à disposition hélicoïdale, de taille 3-4 cm par 0,8-2 cm, persistantes, rouges ou roses (Steffey, 1986). 1 à 5 fleurs blanches successives par bractée (Foumet).</p>	<p>Fleurs hermaphrodites de forme irrégulière de structure unique et compliquée (Steffey, 1986).</p> <p>Périanthe avec un calice et une corolle distincte, corolle et calice fusionnés.</p> <p>Calice tubulaire sur un verticille gamosépale entier mesurant de 8-15 mm, légèrement a profondément lobé. La préfloraison est imbriquée.</p> <p>Corolle de 30 mm sur un verticille gamopétale, le pétale médian est généralement plus volumineux (Watson et Dallwitz, 1992).</p> <p>La fleur est généralement longistyle, mais d'après Perricaud, 1996, 38,6 % des fleurs sont brevistyles</p>	<p>Androcée : libre du périanthe. Présence de deux verticilles de trois étamines transformées en quatre étamines stériles et souvent pétaloïdes (le labelle de 10 mm) une étamine fertile et une étamine avortée (Steffey, 1986).</p> <p>En effet les deux membres latéraux du verticille interne sont soudés pour former un labellum pétaloïde. Les deux membres latéraux du verticille externe peuvent se présenter comme des lobes des étamines fonctionnelles. L'étamine médiane du verticille externe est absente, les étamines latérales des verticilles internes et externes sont toutes transformées en staminodes, l'étamine médiane du verticille interne est présente et modifiée en staminodes fertiles et tétrasporangée (Steffey, 1986 ; Watson et Dallwitz, 1992 ; Foumet <i>et al.</i>). Déhiscence des anthères longitudinale, introrse. Anthères non appendiculées et comportant en moyenne 1299 grains de pollen (Perricaud, 1996).</p> <p>Déhiscence des anthères le matin (à environ 8^h30), le stigmate est réceptif dès l'ouverture du bouton (Perricaud, 1996)</p>	<p>Style apical plus long que les ovaires, stigmate unique de type humide et papillé.</p> <p>Les ovaires trilobulaires, à placentation axile d'<i>Alpinia</i> contiennent environ de 64 ovules par locule, soit environ 180 ovules par fleur selon Perricaud, 1996.</p> <p>Albumen à formation hélobial (Watson. et Dallwitz, 1992).</p>	<p>Les graines sont amidonnées.</p> <p>Un seul cotylédon et il est non assimilateur.</p> <p>Embryon droit et sans chlorophylle.</p> <p>Hypocotyle présent</p> <p>Mésocotyle absent.</p> <p>Première feuille dorsi - ventrale.</p> <p>Racine primaire éphémère (Watson et Dallwitz, 1992).</p>

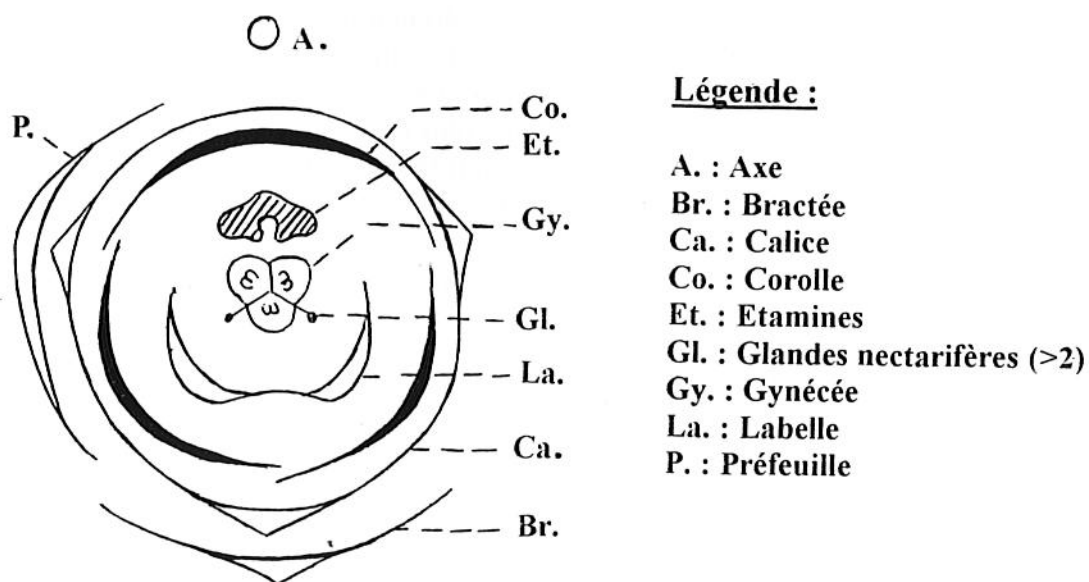


Fig. 2.-Diagramme floral de l'*Alpinia purpurata*.

L'*Alpinia* mesure de un mètre et demi à trois mètres de hauteur, ses rhizomes naissent sans cesse pour former de nouvelles tiges vertes assez grosses portant de grandes feuilles vertes oblongues de 30 à 70 sur 6 à 15 cm (Fournet *et al.*, 1990) (Tableau IV et photo 3 annexe 4).

Ces feuilles glabres sont brièvement pétiolées et possèdent des ligules d'une taille de 5 à 8 mm (Fournet, communications personnelles).

Fournet *et al.* affirment en 1990 que la plante ne produit jamais de fruits dans les conditions antillaises ; mais les inflorescences prolifèrent en donnant de nombreuses plantules qui produisent précocement de petits épis (Photo. 4, annexe 4).

La fleur de l'*Alpinia* est représentée par le diagramme floral fig. 4 et les dessins de la figure 5, annexe 5.

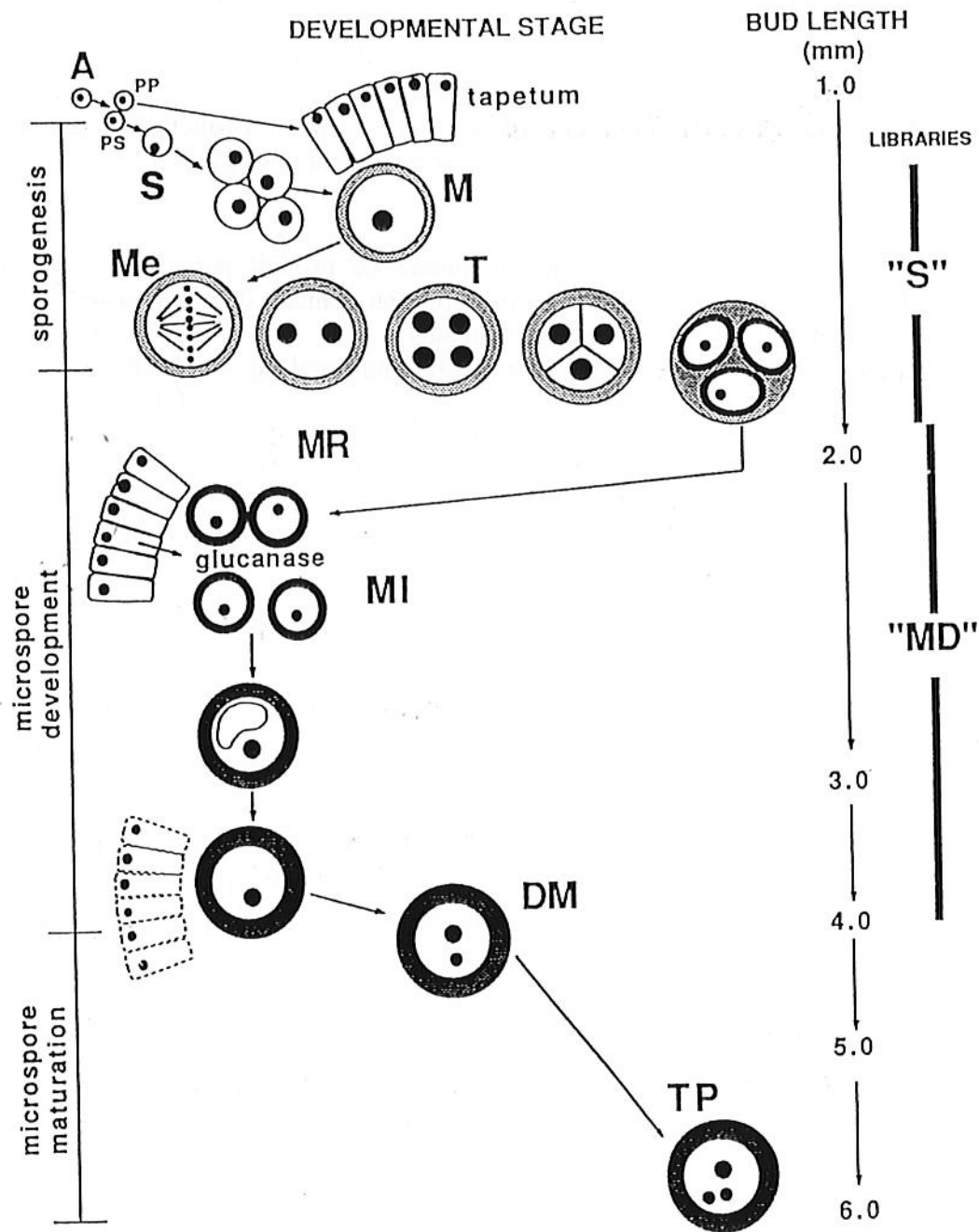


Fig. 6.- Description de la microgamétogenèse chez *Brassica napus*. Selon Scott *et al.* (1991).

II LES ORGANES REPRODUCTEURS ET LA REPRODUCTION DE L'ALPINIA.

II-1 Introduction.

Les fleurs des angiospermes sont très diversifiées en forme, taille et couleur. Fonctionnellement la fleur est un organe composé dont la complexité structurale est en mesure avec le rôle qu'elle doit accomplir : La Reproduction Sexuée.

Des édifices complexes de pièces diversement spécialisées sont apparus chez les Angiospermes. L'inflorescence est un groupe de fleurs parmi lesquelles il n'y a pas de feuilles autre que bractéales. La fleur d'Angiosperme est généralement composée d'une structure répétitive : sépales, pétales (ou tépales), étamines et carpelles. Toutes les structures de la plante peuvent avoir des rôles de protection, d'attraction, ou de récompense au vecteur de pollinisation... (Baker et Baker, 1983 ; Dafni, 1992) (Tableau V, annexe 6 et 7).

Généralement les verticilles les plus externes, de nature et structure sporophytiques, servent principalement à la protection des structures internes de nature gamétophytique, qui sont au sein des carpelles et anthères. Ce sont sur ces dernières unités que nous nous attarderons pour étudier les structures et le fonctionnement de la reproduction sexuée chez l'*Alpinia purpurata*.

II-2 Le pollen.

Les grains de pollen sont d'une remarquable diversité tant pour leurs formes que leurs structures. Leurs évolutions répondent aux mêmes besoins fonctionnels :

- ✓ transport de spermatozoïdes d'une plante à l'autre, transport à travers les tissus du pistil,
- ✓ processus de double fécondation,
- ✓ reconnaissance du soi et non soi.

C'est dans ce contexte que nous aborderons l'étude de la structure et de la germination du pollen.

II-2-1 Structures.

II-2-1-a Les noyaux.

Etant issu d'une méiospore produisant des gamètes mâles (Fig. 6), un grain de pollen est donc un gamétophyte mâle très réduit qui peut porter une portion végétative (Favre-Duchartre, 1970).

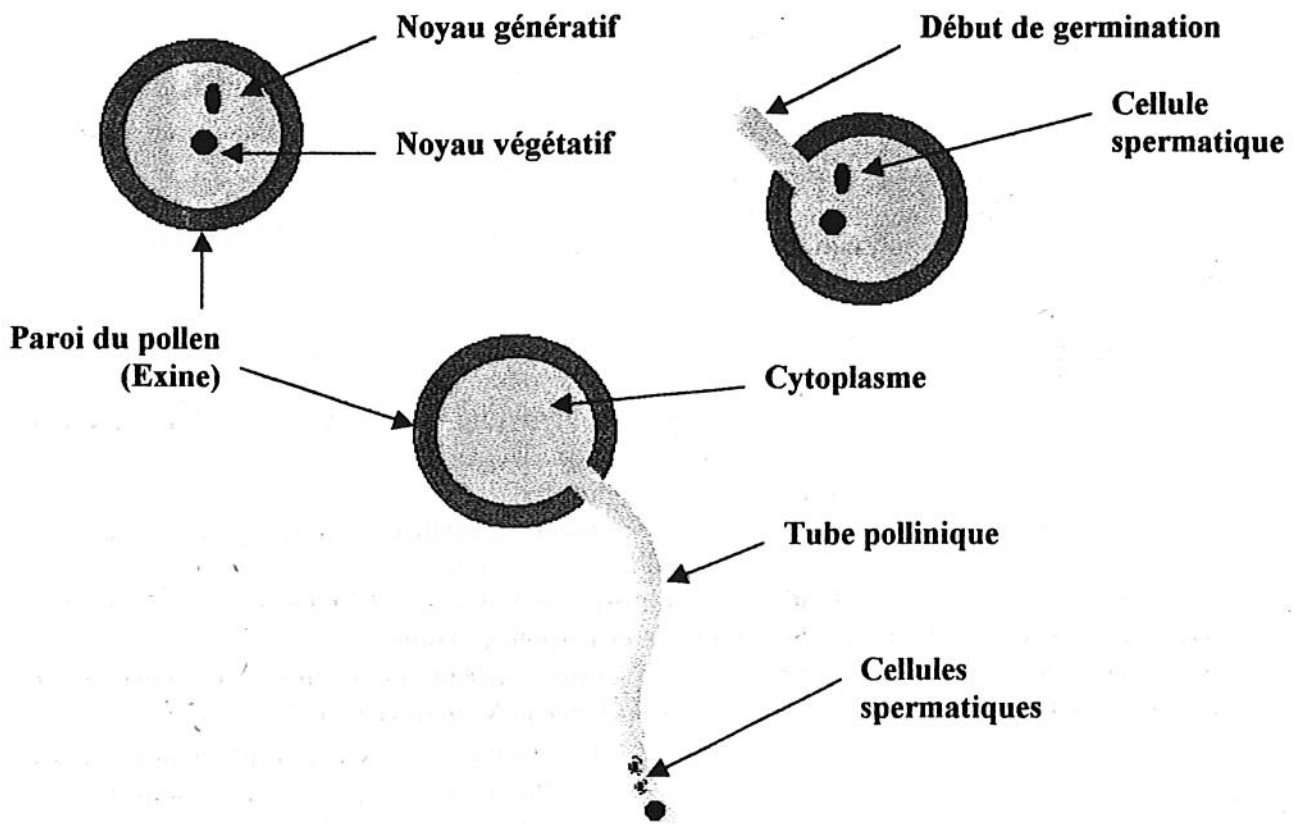


Fig.5.- Germination du pollen.

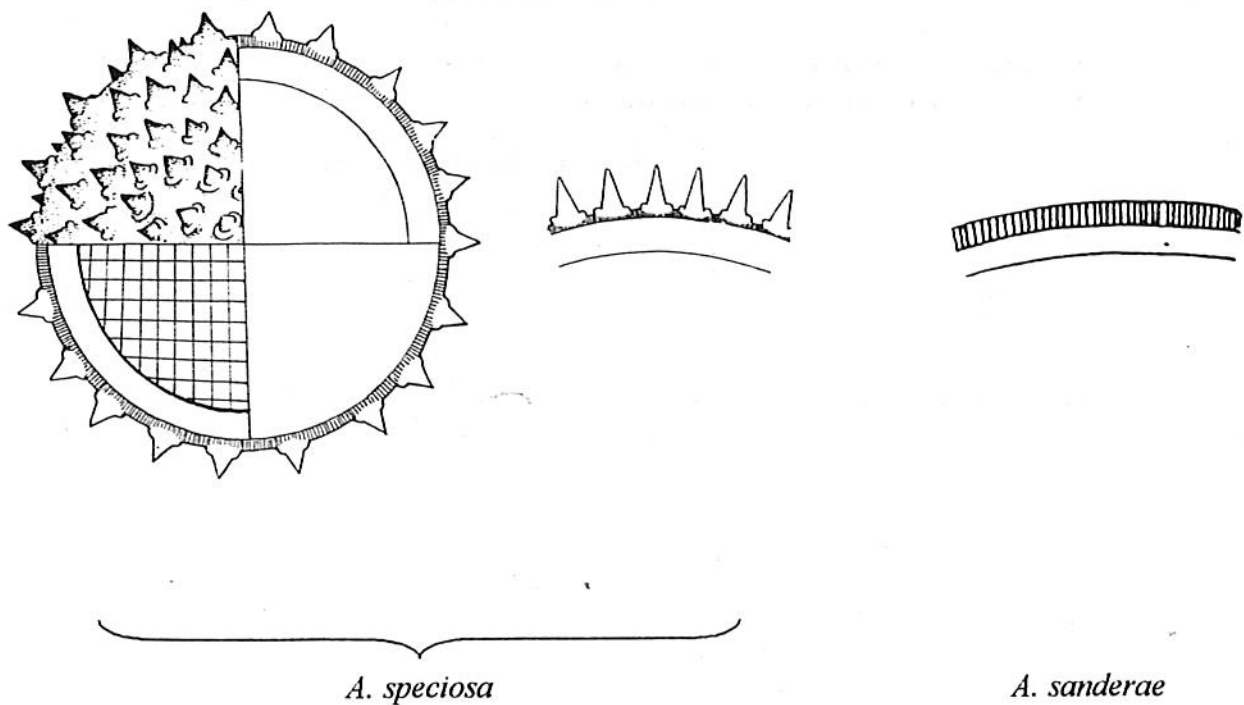


Fig.6.- Pollen morphology of *Zingiberaceae* [selon Mangaly et Nayar (1990)].

Watson et Dallwitz affirment en 1992 que dans le cas des *Zingiberaceae* le pollen est « bicellulaire », la partie végétative du pollen est représentée par un noyau et la partie « reproductrice » est une cellule spermatique ayant une membrane (membrane de la cellule générative) et contenant le noyau génératif (Fig. 7). Cependant ceci reste à montrer chez l'*Alpinia*.

II-2-1-b La paroi du grain de pollen.

La composition de base de la paroi est la « sporollenine » (Favre-Duchartre, 1970). Cette substance proviendrait de la polymérisation de caroténoïdes et leurs esters, qui confère à l'exine des caractéristiques (réactivité cytochimique, présence de composés phénoliques...) proche d'une paroi formée de lignine selon Knox *et al.* (1986).

Une étude palynologique sur les *Zingiberaceae* (et plus particulièrement sur le genre *Alpinia*) par Mangaly et Nayar (1990) a révélé que le pollen est sphéroïde et épineux, et qu'il est constitué de :

- ✓ Une couche d'exine ininterrompue d'une épaisseur de 0,7 à moins de 2 μm de couleur généralement hyaline à jaunâtre et avec ou sans structures épineuses.
- ✓ Une couche d'intine hyaline à marron – jaunâtre, d'épaisseur de 2 à 5 μm et lamellée en 2 à 4 couches uniformes (sauf la plus interne qui est plus épaisse). (Tableau VI annexe 8 et fig. 8).

Les grains de pollen d'*Alpinia* ne présentent pas d'amincissement des couches d'intine et/ou d'exine ni d'épaississement d'une couche dite « membraneuse » permettant la germination du pollen d'après Mangaly et Nayar (1990). Ils sont donc inaperturés, ou plutôt « omniaperturés » (Mangaly et Nayar, 1990). L'unique tube pollinique émis par le gamétophyte mâle d'*Alpinia* sort aléatoirement selon les imperfections de la paroi.

II-2-2 Germination.

Une étape préalable est nécessaire avant l'émission de tube pollinique il s'agit de l'hydratation. Le pollen mature est déshydraté, la valeur limite d'hydratation se situe à 20 % de son poids frais en eau. En fait, en dessous de cette limite les membranes se déstructurent ce qui aura pour effet de retarder le passage de l'eau du milieu hypoosmotique : le stigmate, vers le milieu hyperosmotique : le pollen (Dumas et Gaude, 1981 ; Knox *et al.*, 1986). Un pollen ayant donc un taux d'hydratation inférieur à cette limite aura une germination retardée.

Les stigmates de *Zingiberaceae* sont de type humide (Watson et Dallwitz, 1992) et donc la pollinisation effectuée, le pollen adhère à la surface stigmatique, parmi les papilles stigmatiques dégénérantes (Stöesser et Anvari, 1983). Ces papilles stigmatiques en subissant une sénescence précoce permettent à maturation la libération d'un exsudat hydrophile qui induira l'hydratation du pollen et sa germination (Herrero M., 1992). Mais est ce applicable à l'*Alpinia purpurata* ?

L'hydratation se fait théoriquement grâce aux ouvertures, l'exine étant une paroi hydrofuge dont la rigidité évite l'éclatement du pollen. Dans le cas de notre plante, on peut considérer que ce processus s'effectue au travers de toute la paroi (en considérant le pollen d'*Alpinia* « omniaperturé »). On observe alors un gonflement du pollen et un changement de forme.

Une protubérance saillit ensuite de la paroi. Il s'agit du futur tube pollinique, qui provient en fait d'une couche « membraneuse ». Celle-ci va croître lors de la germination perçant la paroi du grain de pollen (Mangaly et Nayar, 1990). On pourra observer pendant l'élongation du tube pollinique une augmentation de l'activité mitochondriale coordonnée par le noyau végétatif (Raynal *et al.*, 1992), et le contenu du grain de pollen se déversera dans le tube pollinique.

II-2-3 Croissance des tubes polliniques dans le gynécée.

Bartz et Stoesser (1989) et Herrero (1992) constatent deux phases de croissance des tubes polliniques à travers le pistil de *Prunus*. Ce phénomène est généralisable aux autres plantes à pollen bicellulaire et donc sans doute applicable à l'*Alpinia* :

- Une phase autotrophe où la croissance est limitée, le pollen se nourrissant alors de ses propres réserves.
- Une phase hétérotrophe se différenciant de la dernière car la croissance des tubes polliniques est plus rapide ; ceux-ci se nourrissent à partir des réserves du style qui sont mobilisées peu après l'anthèse (amidon, et autres carbohydrates).

Les tubes polliniques en se développant déposeront plus ou moins régulièrement des bouchons de callose bien visibles en microscopie à épifluorescence (cf. **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE II-6-2** La microscopie à épifluorescence.).

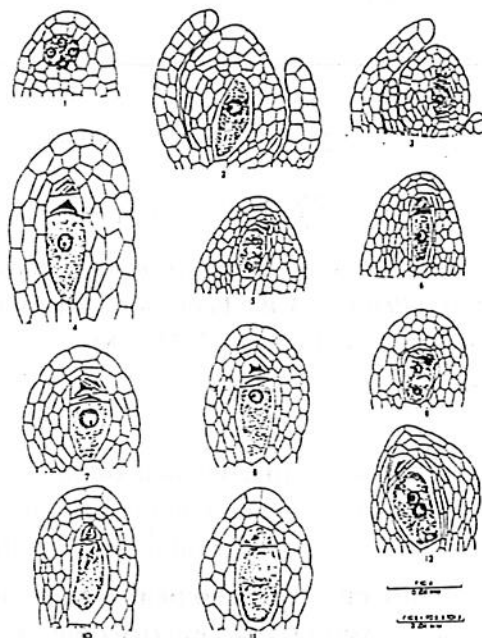
Les noyaux du pollen vont migrer le long du tube pollinique, pendant la croissance du tube pollinique (Knox *et al.*, 1986). Knox *et al.*, affirment en 1986 que cette migration est rendue possible car la cellule générative et le noyau végétatif sont reliés par une membrane commune. Selon Lécuyer *et al.* (1991) les noyaux atteignent le tiers du tube pollinique en 8 heures chez le pommier. C'est pendant cette migration que le noyau génératif se divise en deux cellules spermatiques. Cette division serait inégale ce qui supposerait donc que les cellules spermatiques alors formés ne procéderaient pas à une fécondation des noyaux polaires et de l'oosphère au hasard, mais que au contraire, grâce à leurs différences, ils seraient déterminés à féconder d'une part l'oosphère et d'autre part les noyaux polaires (Knox *et al.*, 1986). Arrivé au bout du tube pollinique, le noyau végétatif dégénère, ayant achevé son rôle de coordonneur des processus métaboliques du gamétophyte mâle.

II-3 Ovules et sac embryonnaire (S.E.).

Les ovules et sacs embryonnaires d'*Alpinia* ne sont actuellement pas décrits dans la littérature, c'est pourquoi une étude générale va récapituler les connaissances concernant les ovules des angiospermes et particulièrement des *Zingiberaceae*. Nos résultats d'observations permettront par la suite de décrire les ovules d'*Alpinia*.

II-3-1 Ontogenèse de l'ovule.

La gamétogénèse femelle aura pour but de former des gamètes femelles aptent à produire d'une part un zygote et d'autre part une cellule mère de l'albumen après fécondation par un gamète mâle.



Figures 1-12. 1. L. S. portion of ovule showing group of megaspore mother cells in *P. pinnata*. 2. An enlarged megaspore mother cell in *P. pinnata*. 3, 5, 9. Linear tetrad of megaspores in *D. latifolia*, *D. sissoo* and *D. scandens*. 4, 6, 7. T-shaped tetrads in *Pterocarpus marsupium*, *Dalbergia paniculata* and *Pongamia pinnata*. 8. A triad in *P. pinnata*. 10-12. Dyad and triad stages in the bisporic development of *P. pinnata*.

Fig. 7.- Mégasporogénèse chez quelques *Dalbergiaceae*. Selon Seshavatharam et Subba (1982).

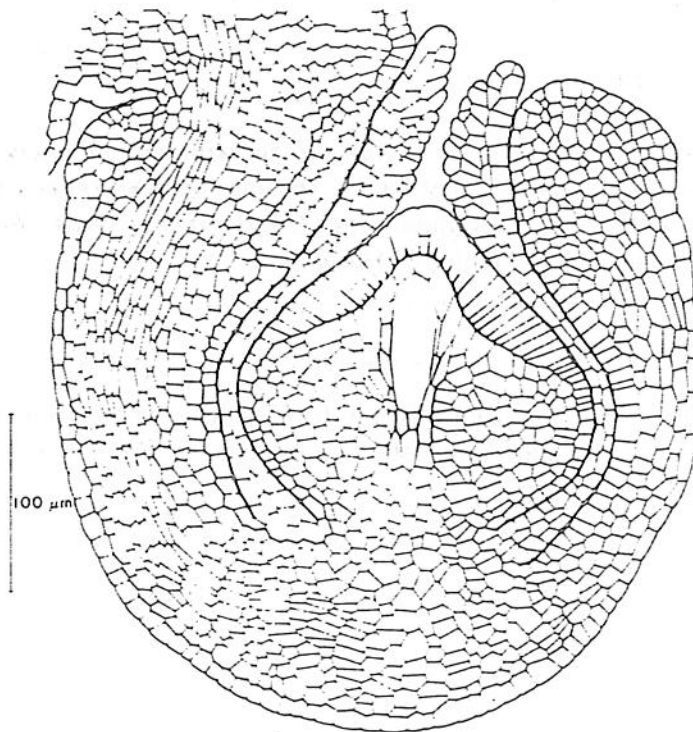


Fig. 8.- Coupe longitudinale d'un ovule mature de *Costus cuspidatus*. Selon Grootjen et Bouman (1981).

Selon Favre-Duchartre (1970), l'oosphère, est produit dans un archégone élaboré par le gamétophyte (ou Prothalle). Celui-ci dérive d'un macrosporange indéhiscent, le nucelle, qui différencie un macrosporocyste, encore appelé cellule mère possédant un noyau volumineux et un cytoplasme dense. La cellule mère va subir une **méiose** formant une tétrade de macrospores alignées selon l'axe de symétrie du nucelle, dont une seule survivra. Généralement la macrospore la plus profonde est l'élue, dans ce cas la macrosporogenèse est dite de type *Polygonium* (Fig. 9). C'est ce type de gamétogenèse qui est retrouvée chez les *Zingiberaceae*, cependant cela reste à confirmer pour l'*Alpinia* (Watson et Dallwitz, 1992). Selon Favre-Duchartre (1970), ceci proviendrait du fait que cette cellule ci-dessus dénommée est la mieux placée par rapport aux tissus nourriciers du nucelle (chalaze). Selon Pimienta et Polito (1983) l'évolution de cette macrospore chez l'amandier se fera par une division mitotique en deux noyaux progéniques qui vont migrer chacun vers un pôle. Les **mitoses** successives formeront deux amas de quatre cellules dont une de chaque va migrer vers le centre du sac embryonnaire pour former la cellule centrale binuclée. Les trois autres cellules à chaque pôle formeront les antipodes (du côté de la chalaze) et les synergides et l'oosphère (du côté du micropyle).

Le nucelle doit nourrir les gamétophytes mâles et femelles, c'est pourquoi autour du macrosporè des fusions cellulaires et fusions nucléaires s'effectuent. Celles-ci ont pour effet de former un cytoplasme dense et chromatophile. Ces cellules nucellaires, dit « tapis nourricier », forment finalement un plasmode, lieu où se développera le sac embryonnaire (ou gamétophyte femelle). Le développement de ce dernier se fait dans un premier temps à l'état coenocytique (c'est à dire que les noyaux resteront indépendants, et ne fusionneront pas) jusqu'à atteindre le nombre de $2^3=8$ noyaux, qui seront ensuite partagés en autant de cellules (Favre-Duchartre, 1970).

II-3-2 Structures de l'ovule et du sac embryonnaire mature.

II-3-2-a l'ovule.

L'ovule est un macrosporange indéhiscent et tégumenté. Il est généralement bitégumenté comme pour *Musa acuminata* avec un tégument externe plus épais que l'interne (Bouharmont, 1963), mais les contres exemples existent tel le pétunia qui est unitégumenté. La seule ouverture présente est le micropyle (étymologiquement : « la petite porte ») que ménage le tégument en face du sommet du nucelle. Les *Zingiberaceae* ont un intratégument qui ne participe pas à la formation du micropyle, celui-ci n'est formé que par le tégument externe et est protégé par un renflement du funicule jouant le rôle d'obturateur-guide pour les tubes polliniques (Watson et Dallwitz, 1992). Sous les téguments de l'ovule et au niveau du micropyle une calotte qui est constituée de plusieurs assises cellulaires peut être présente, les ovules sont alors dit **crassinucellés**. Mais si cette calotte ne présente qu'une seule couche de cellules, l'ovule sera dit **tenuinucellé** (Favre-Duchartre, 1970) (cf ; fig. 10).

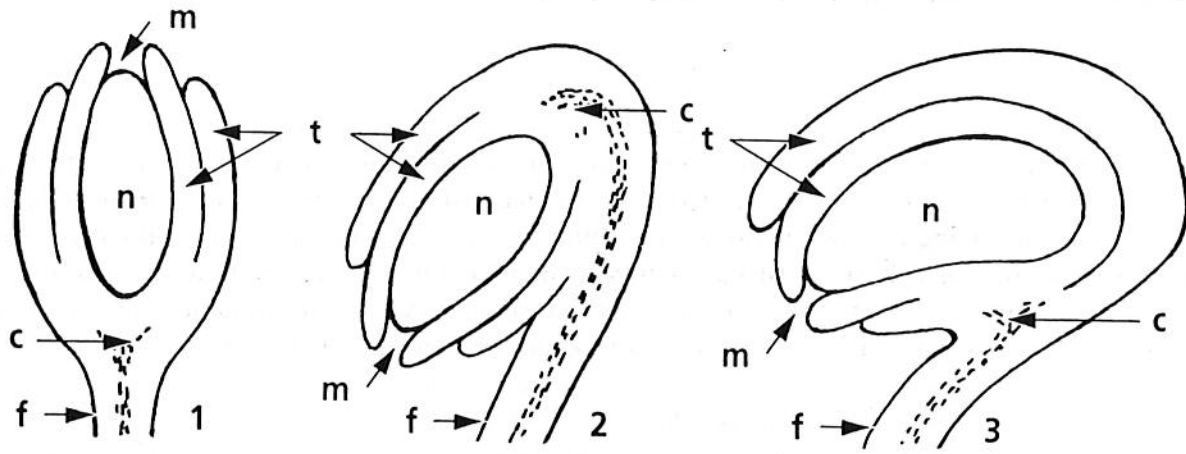


Fig. 9.- Différents types d'ovules. Selon Raynal-Roques (1994).

1 - Ovule orthotrope. Chalaze et micropyle sont aux deux pôles opposés de l'ovule ; le funicule est du côté de la chalaze, à l'opposé du micropyle. 2 - Ovule anatrope. Le port inversé de l'ovule résulte d'une courbure du funicule. Chalaze et micropyle sont aux pôles opposés ; le funicule est proche du micropyle. 3 - Ovule campylotrope. L'ovule est dissymétrique. Chalaze, funicule et micropyle sont réunis du même côté. Bien que d'observation constante à l'intérieur de grandes unités systématiques telles que les familles. **c**, chalaze ; **f**, funicule ; **m**, micropyle ; **n**, nucelle qui contient le sac embryonnaire ; **t**, téguments de l'ovule.

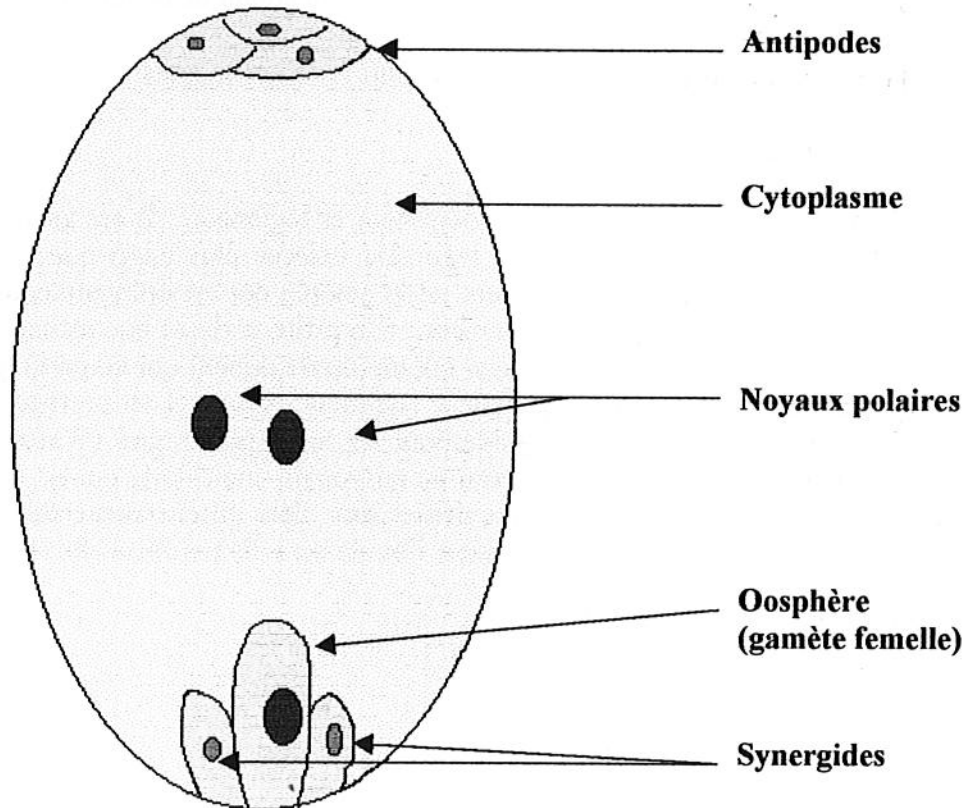


Fig. 12.- Le Sac embryonnaire.

Le point d'attache de l'ovule au reste de la plante est le hile d'où part le funicule, qui constitue son lien d'alimentation. Dans le cas des ovules anatropes, comme c'est le cas pour 90 % des Angiospermes, le corps de l'ovule retourné adhère au funicule, formant sur l'un de ses flancs une côte saillante parcourue par un cordon conducteur que l'on appelle le raphé. Cette irrigation en provenance du reste de la plante mère et à destination du nucelle, débouche au fond de ce dernier, en un point dénommé chalaze qui se trouve à l'opposé du micropyle et du hile. Mais les ovules peuvent être de type orthotrope (=droit) ou campylotrope (=courbe) (cf. fig. 11).

II-3-2-b Le sac embryonnaire.

La figure 12 caractérise un sac embryonnaire que l'on pourrait qualifier de « théorique ». On observe, chez les *Zingiberaceae* un massif cellulaire du côté micropylaire constitué de l'oosphère (qui fécondée produira l'embryon plantule) flanquée de deux synergides en forme de poire ou crochétées (Watson et Dallwitz, 1992).

Au milieu du sac siègent deux noyaux libres et centraux : les noyaux polaires dont la fécondation produira le zygote-albumen.

Les dernières cellules du sac embryonnaire sont regroupées en un massif tricellulaire, qui d'après Favre-Duchartre (1970), sont les seules cellules végétatives (c'est à dire les cellules ne jouant ni un rôle de gamètes, ni celui d'une cellule appartenant à un archégone, qui est un appareil sexuel). Ces trois cellules sont situées à l'opposé du micropyle et sont appelées pour cette raison « antipodes ». Ce second massif cellulaire, est absent chez les *Zingiberaceae* (Watson et Dallwitz, 1992). Ceci restera à confirmer dans le cas de l'*Alpinia*.

II-3-3 Maturation du sac embryonnaire.

Selon Pimienta et Polito (1983), nous pouvons tout aussi bien avoir des sacs embryonnaires qui seront matures à l'anthèse, mais aussi des sacs embryonnaires qui ne seront pas formés à l'anthèse comme c'est le cas pour *Prunus dulcis*. Le développement du sac embryonnaire sera alors stimulé par la présence de tubes polliniques compatibles dans le style et la maturation du sac embryonnaire se fera grâce à une pollinisation croisée. Dans le cas de plantes autoincompatibles autopollinisées ou de gynécées non pollinisées, on note la présence de nombreuses défaillances dans la croissance du sac embryonnaire (avortement du mégagamétophyte, absence de fusion des noyaux polaires, différenciation tardive de la mégaspore...). Au contraire, chez le bananier la croissance du sac embryonnaire se fait avant l'anthèse (Bouharmont, 1963), il en est de même pour les genres *Cichorium* et *Linum*, pour qui la fusion des noyaux polaires se fait 30 heures avant l'anthèse, qu'il y est eu pollinisation ou pas (Leveil *et al.*, 1985)

II-4 La pollinisation et fécondation.

L'*Alpinia* étant peu cité dans la littérature une étude générale décrira les grandes étapes de la pollinisation et de la fécondation des ovules. Ceci permettra alors de discerner les différentes barrières physiques ou chimiques qui peuvent entraver la reproduction sexuée. Ces barrières pourront alors être comparées à nos observations effectuées sur l'*Alpinia* dans le but de déterminer les barrières s'opposant à l'hybridation sexuée de l'*Alpinia purpurata*.

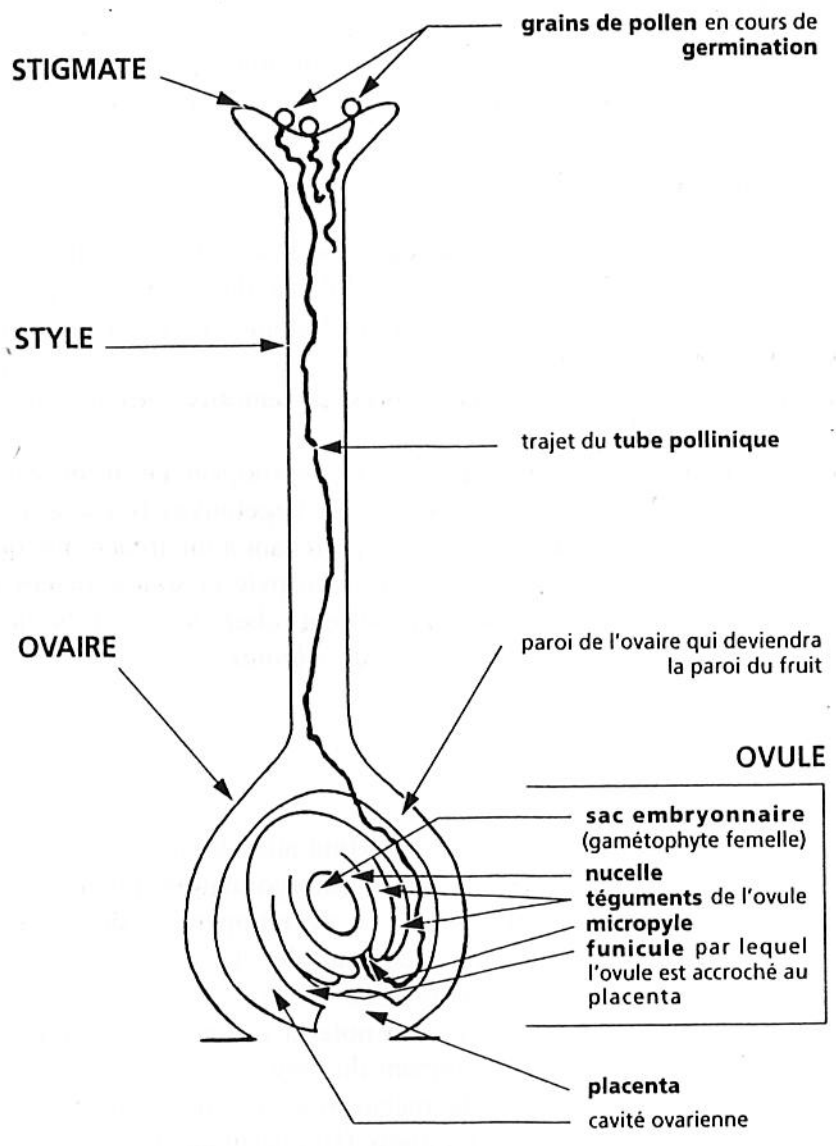


Fig. 11.- Le pistil, lieu où se produit la fécondation (schéma fonctionnel). Selon Raynal – Roques (1994).

II-4-1 La pollinisation autogame et allogame.

L'allogamie est porteuse d'un avenir évolutif. Au contraire les autofécondations (autogamie) assurent la survie immédiate de l'espèce dans un état de relative fixité (Raynal-Roques, 1994). Il est maintenant admis qu'un certain nombre d'espèces ont évolué secondairement, à partir d'un mode de fécondation croisée, vers une autofécondation régulière. Cependant malgré ce passage vers un mode d'autogamie la formation d'embryons issus d'un allopollen pourra être favorisé : Brahim *et al.* (1990), ont observé sur une variété autogame de *Lathyrus* que le nombre de graines par gousses reste plus grand en allopollinisation qu'en autopollinisation ; De même Kahm et De Masson (1986), ont constaté, sur *Citrus*, que même si une autofécondation se produit quelques heures avant une allopollinisation, le nombre d'alofécondations sur le nombre d'autofécondations sera grand.

II-4-2 Développement des tubes polliniques et comportement des ovules.

II-4-2-a Les conditions de progression des tubes polliniques.

Le tube pollinique initié va devoir pénétrer les tissus stigmatiques en émettant des cutinases, carbohydratases pour fragiliser les parois cellulaires faisant obstacle et les tissus conducteurs du style. Ces tissus ont des cellules avec des parois plus ou moins gélifiées qui libèrent pendant leur lyse des composés pectiques et de l'amidon assurant la nutrition du pollen étranger hétérotrophe, qui aura alors une croissance accélérée (Knox *et al.*, 1986). Le style est alors dit de type ouvert, car les tubes polliniques sont guidés à travers un canal plein de mucilage au centre du style (cf. fig 13).

La progression des tubes polliniques est orientée par une source d'humidité peu oxygénée et par les sécrétions ovariennes (chimiotropisme) (Raynal-Roques, 1994). Dès lors une augmentation d'activité biochimique et cytoplasmique se fera ressentir dans le pistil :

- ✓ augmentation du nombre de polysomes,
- ✓ changements (qualitatifs et quantitatifs) dans les ARN transcrits (Herrero, 1992),
- ✓ changements du taux d'amidon et augmentation du taux de glucose (Tupy, 1961),
- ✓ augmentation de la respiration... (Herrero, 1992).

II-4-2-b La coopérativité et la compétition entre tubes polliniques.

Selon Björkman (1995), Bartz et Stösser (1989), pendant la croissance des tubes polliniques un phénomène de coopérativité s'instaure, ainsi plus le nombre de grains de pollen sera grand sur le style, meilleure sera la nouaison. D'autre part le nombre de tubes polliniques décroît lorsque l'on effectue des comptages du stigmate vers les ovaires. Ceci a lieu malgré la coopérativité des tubes polliniques dans le style et malgré la compatibilité du croisement. Kahm et De Masson (1986) expliquent ce phénomène par la compétition qui existe entre les tubes pour les nutriments apportés par les tissus du pistil. Ainsi, dans ce grand lot de tubes polliniques, seuls les plus vigoureux fertiliseront les ovules. Les embryons formés seront vigoureux (Björkman, 1995), et la nouaison n'en sera que meilleure (Cerovic, 1992).

Les tests de viabilité et de germination de pollen sont importants, car un pollen peut être présent en grande quantité sur un stigmate et le nombre de tubes polliniques ne sera pas assez grand pour avoir ce phénomène de coopération et de compétitivité, ce qui entraînera une baisse considérable de la nouaison. On doit donc pouvoir estimer le nombre de grains de pollen qui va germer (et donc estimer en fonction du nombre de grains de pollen déposés, le nombre de tubes polliniques qui seront présents dans les tissus du style).

II-4-2-c Les facteurs limitants et facilitants la fécondation.

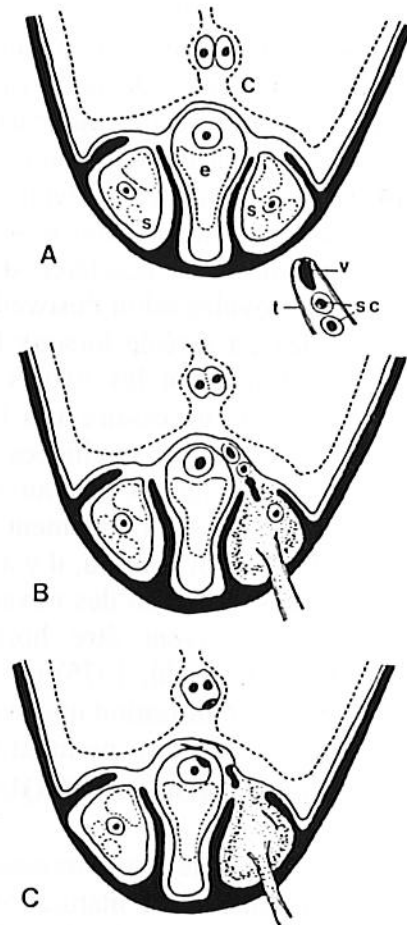
La pollinisation doit être effectuée le plus tôt possible à l'anthèse, car plus la pollinisation est retardée plus la nouaison sera mauvaise. Chez l'*Alpinia purpurata*, il a été défini une période de réceptivité durant 11 heures et s'étalant de sept heures du matin à dix-huit heures (Perricaud, 1996). Cette période dépassée, il y aura sénescence et mort du stigmate, les cellules de transmission du style meurent (donc elles n'assureront plus leur rôle nourricier). D'autre part il semblerait que les ovules, dont la longévité est plutôt courte, seront le principal facteur limitant (Stöesser et Anvari, 1983). Cette longévité des ovules est d'autant plus courte que la température ambiante est grande. Cependant cette augmentation de température aura aussi pour effet une croissance des tubes polliniques accrue. Néanmoins cette augmentation de vitesse de croissance ne sera pas suffisante pour compenser totalement l'effet vieillissant de la température sur les ovules. On peut donc définir une période effective de pollinisation (temps de longévité des ovules auquel on soustrait le temps de croissance des tubes polliniques dans le style) qui sera maximale pour une température optimale qui permettra une croissance accélérée des tubes polliniques et qui ne favorisera pas une sénescence trop rapide des ovules selon Postweiler *et al.* (1985).

Néanmoins la sénescence des ovules est arrêtée lorsque la pollinisation a été effectuée. Selon Fuller et Leopold (1975), après pollinisation les ovules peuvent même reprendre leur croissance pour atteindre le degré de maturation nécessaire à la fécondation lorsque les gamètes seront en présence. On peut prendre l'exemple des Orchidées qui ne voient leurs ovules se développer que lorsque la pollinisation a été effectuée. Les ovaires reçoivent donc des signaux de croissance en provenance des tubes polliniques assez rapidement après la pollinisation et ceci se poursuit à l'arrivée des tubes polliniques dans les ovaires où, il y a à ce moment la dégénérescence d'une des synergides selon Knox *et al.* (1986) et fusion des noyaux polaires avant la fertilisation (Watson et Dallwitz, 1992). Ces signaux peuvent être hormonaux (auxines, cytokinines, gibbérellines), de nature nucléaire (Fuller et Leopold, 1975) ou même électrochimique, dans ce dernier cas le message induit 9 heures après la pollinisation une synthèse de protéines et un second message (environ 18 heures après la pollinisation) permettra la reconnaissance de pollen compatible ou incompatible (cf. **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE II-5 Les phénomènes de compatibilité et d'incompatibilité.**).

Cependant un phénomène encore mal connu semble être intéressant pour la fécondation : en effet le génotype du pollen peut influencer la taille et la maturation du fruit, sans qu'il y est eu fécondations d'ovules (comme un pollen « mentor » qui est rendu inapte à féconder). Les tubes polliniques vont croître et donc donner le signal de croissance aux ovules et ovaires, mais sans les féconder comme l'ont décrit Fuller et Leopold (1975). L'activité générale du gynécée accrue, le sac embryonnaire suivra le même chemin et se développera, on obtient donc des fruits parthénogéniques par développement d'une cellule haploïde (Lecuyer *et al.*, 1991).

II-4-2-d Les ultimes étapes de la pollinisation.

La progression des tubes polliniques dans les ovaires se fait ensuite grâce à un thigmotropisme (Knox *et al.*, 1986) associé à un chimiotropisme induit par les sécrétions de l'ovule selon Herrero (1992). Les tubes polliniques peuvent donc se « localiser » grâce aux surfaces (parois des styles, parois placentaires, parois des ovaires...) les entourant et donc suivre un schéma de croissance déterminé. Knox *et al.* affirment, en 1986, la présence dans les ovaires d'obturateurs et de sillons le long des placentas, ce qui facilite la fécondation car ces sillons dirigent les tubes vers les ovules. Pour parfaire ce système de guidage, des sécrétions proviendraient des synergides, qui selon Favre-Duchartre (1970) sont des cellules à caractère méristématique (nombreux plastes, issus de l'appareil de Golgi, accumulant de l'amidon ; nombreuses mitochondries...). Knox *et al.* (1986), publient que ces mêmes synergides et les tissus



Scheme showing events of fertilization based on studies of cotton embryo sacs (Jensen 1974) and recent work on *Plumbago* (Russell and Cass 1981b; Russell 1984). A—Micropylar region of embryo sac with two synergids (s), egg cell (e), and central cell (c), showing approaching pollen tube (t) containing vegetative nucleus (v) and two sperm cells (sc). B—Entry of pollen tube and discharge of sperm cells into periplasm between the egg and central cell leading to cellular fusion. C—Nuclear fusion completing double fertilization.

Fig. 12.- Les grands événements de la fécondation. Selon Knox *et al.* (1986).

du micropyle seraient aptes à libérer du calcium et des polysaccharides provoquant alors une croissance des tubes polliniques. L'accès au sac embryonnaire est en outre facilité, puisque le micropyle est dirigé vers les surfaces placentaires (pour les ovules campylotropes et surtout anatropes) ; et puisque la cellule centrale et l'oosphère sont proches du micropyle. De nombreux systèmes sont donc mis en place pour assister la fécondation.

II-4-3 Fécondation.

A l'arrivée des ovules, la croissance des tubes polliniques (t.p.) se ralentit, (et même parfois elle s'arrête), un autre arrêt est effectué à l'approche du micropyle (Fig 14 [A]). Les tubes polliniques prennent alors souvent l'allure d'une branche ou d'une spirale, ce qui résulterait des interactions avec les substances sécrétées du micropyle (Knox *et al.*, 1986). Chez certaines espèces une ou les deux synergides dégèrent à l'arrivée des tubes polliniques. Le relâchement des noyaux génératifs, dans la synergide dégénérée, s'opère grâce à la formation d'un pore terminal dans la membrane du tube pollinique ou parfois même l'apex du tube est détruit ; tandis que le noyau végétatif dégèrera dans le tube pollinique. Cette synergide dégénérée libère son cytoplasme qui peut aller dans l'espace périplasmique, mais la cellule centrale et l'oosphère ainsi que les cellules génératives semblent protégées de ce milieu souillé de déchets métaboliques (Fig 14 [B]). Ensuite la fusion des cellules génératives avec la cellule centrale et l'oosphère se fera mais avec encore une fois un système de reconnaissance porté par les membranes des cellules (Fig 14 [C]) (cf. **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE II-5-2-c** Les ovules.). Lors de cette fusion le cytoplasme de la cellule générative peut être intégré dans le cytoplasme du zygote (ce qui soulève le problème de la transmission héréditaire des caractères extranucléaires) ou peut être libéré dans la synergide sénescence (dans la cas du zygote albumen le cytoplasme du gamétophyte mâle semble toujours introduit avec le noyau dans la cellule centrale) (Van Went, 1992). Les cellules spermatiques se dirigent alors vers la cellule centrale et l'oosphère. Selon Knox *et al.* (1986), le choix du noyau qui fécondera l'oosphère est effectué à l'aide de caractères distinctifs membranaires des cellules spermatiques. Après la fusion cellulaire des cellules spermatiques avec la cellule centrale et l'oosphère, on aura la fusion nucléaire des noyaux. Celle ci se fera par accollement des membranes nucléaires et les noyaux seront reliés par des cisternes du réticulum endoplasmique permettant l'initiation de la fusion nucléaire (Van Went, 1992). On obtiendra donc finalement une cellule centrale triploïde et une cellule œuf diploïde.

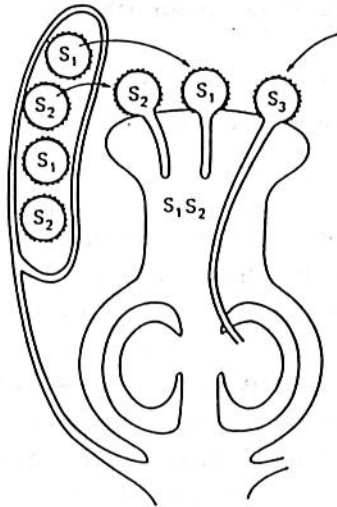
Favre-Duchartre (1970), s'étonne de voir que l'union de deux gamétophytes dont la durée de vie ne dépassait pas quelques heures, permet à l'ovule d'acquérir une force nouvelle. Chez certains genres, les noyaux resteront un temps variable dans cet état coenocytique, puis la mise en commun des chromosomes des deux sexes se réalisera à la première prophase diploïde (caryogamie « postmitotique », contrairement à la caryogamie « prémitotique » où là, il y a un stade interphasique du noyau diploïde avant d'entrer en mitose). Cependant chez certaines plantes comme le bananier, genre proche de l'*Alpinia*, la pénétration du tube pollinique provoque l'obscurcissement de la région où se trouve les noyaux polaires. Quand le cytoplasme devient plus clair, la fusion de l'oosphère avec l'un des gamètes est terminée. Le zygote possède un ou deux nucléoles, les synergides ont disparu. Le noyau endospermique commence à se diviser presque aussitôt, le zygote se développe plus tardivement (Bouharmont, 1963).

Les mécanismes facilitant la fécondation sont nombreux :

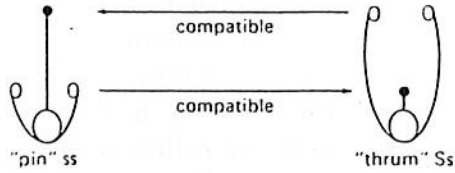
- ✓ Ils peuvent être causés par la pollinisation : formation d'exsudat, libération de carbohydrates, augmentation de la durée de vie des ovules...
- ✓ Mais ils peuvent aussi être indépendants de la pollinisation : liquéfaction de l'obturateur à la base des styles d'arbres à fruits lors de sa sénescence cédant alors le passage vers les ovules (Herrero, 1992).

Mais il faut aussi noter la présence de barrières que le gamétophyte doit surmonter pour accomplir une fécondation.

Gametophytic self-incompatibility: Pollen tubes carrying an allele present in the pistil are arrested in the style. Pollen phenotype controlled by its own haploid genotype.



Heteromorphic self-incompatibility in a distylic plant eg. *Primula*. Populations are composed of two flower forms.



The only compatible pollinations are those between anthers and a stigma at the same level.

Fig. 13.- Les différents types d'incompatibilité. Selon Knox *et al.* (1986).

II-5 Les phénomènes de compatibilité et d'incompatibilité.

La compatibilité et l'incompatibilité sont des phénomènes spécifiques qui permettent le contrôle et la reconnaissance des éléments reproducteurs. Ce phénomène est basé sur le fait que l'organe reproducteur femelle est capable de distinguer un gamète mâle qui sera apte à assurer la fécondation et/ou entraînera une diversité génétique de la descendance. Dans le cas de l'auto-incompatibilité, le pistil identifiera l'auto-pollen (pollen issu de la même fleur) et empêchera l'auto-pollen de féconder les ovules. Ce phénomène se dresse donc contre l'autopollinisation qui permet la formation de descendance essentiellement homozygote, donc que la plante doit éviter pour assurer la diversité.

Il existe en outre un système de reconnaissance de l'allo-pollen (pollen originaire d'une fleur génétiquement plus éloignée) : l'incompatibilité interspécifique. Il s'agit donc d'une barrière génétique contre les phénomènes d'incongruité (fécondations entre des gamètes issus de plantes d'espèces différentes).

L'étude de ces phénomènes est d'une importance capitale pour que la méthode traditionnelle d'hybridation sexuée soit source de variabilité satisfaisante pour les programmes d'amélioration des végétaux. Notre capacité à manipuler les processus de pollinisation, et d'incompatibilité doit donc se préciser pour permettre d'outrepasser les barrières qui pourraient se mettre en place lors de croisements chez l'*Alpinia*.

La reconnaissance se baserait généralement sur la formation d'une molécule complémentaire, stimulante ou inhibitrice, par chacun des pistils et pollen (Dumas et Gaude, 1981).

II-5-1 Quelques définitions.

Pour Knox *et al.* (1986), il existe deux grands types d'incompatibilité :

- ✓ L'Autoincompatibilité hétéromorphique, qui assure le rejet du pollen par un faible nombre d'allèles qui sont associés avec des caractères morphologiques floraux (longueur du style, morphologie du stigmate, taille du pollen...) (Fig. 15 [A])
- ✓ L'Autoincompatibilité multiallèlique homomorphique, le rejet du pollen est assuré par la présence de protéines et glycoprotéines spécifiques issues de multiples allèles d'un seul locus (S). Celle-ci peut se manifester sous deux formes (Raynal-Roques, 1994 ; Kahm et De Masson, 1986) :
 - Autoincompatibilité de type gamétophytique qui se manifeste quand le génome haploïde du pollen est confronté à celui, diploïde, du stigmate ; il suffit d'un allèle commun entre eux pour qu'il y ait incompatibilité. Comme le pollen a subi une méiose à partir d'une cellule de la plante mère hétérozygote, un pollen sur deux portera l'allèle induisant l'incompatibilité sur une plante ayant un allèle en commun avec la plante mère (ce phénomène d'incompatibilité s'observe dans les tissus du style jusqu'aux ovaires chez les Convolvulacées, Graminées, Orchidées... (Fig. 15 [B])).

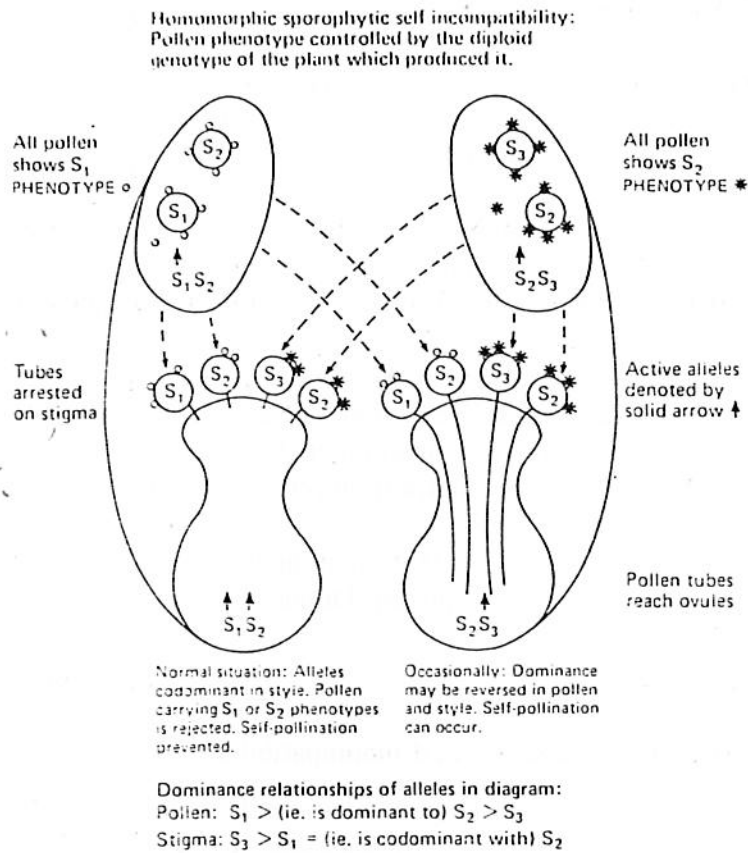


Fig. 13.- Les différents types d'incompatibilité. Selon Knox *et al.* (1986).

- Autoincompatibilité de type sporophytique qui se manifeste quand il existe un allèle dominant commun entre les deux génotypes diploïdes confrontés : celui de l'exine qui présente la phénotypie de l'allèle dominant de la plante mère et celui du stigmate (elle s'observe fréquemment juste en dessous de la surface stigmatique chez les Composées, Crucifères, Chénopodiacées... (Fig. 15 [C]).
- ✓ Il existe d'autres types de barrières, d'après Knox *et al.* (1986) :
- La barrière postzygotique qui empêche le développement d'un embryon par l'association de gènes qui assemblés sont létaux. Ce type d'incompatibilité gaspille le matériel végétal, puisqu'il élimine les œufs fécondés par rejet de l'albumen selon une réaction, entre les tissus diploïdes des ovules et l'œuf triploïde de la cellule centrale (cf. **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE II-5-4** Les chromosomes et l'incompatibilité.).
 - Les rejets de pollens « interspécifiques » évitant les incongruités se font par des systèmes généralement moins sophistiqués (fluides stigmatiques permettant l'hydratation du pollen ou non...), mais aussi par des systèmes similaires aux précédents par l'utilisation du locus S.

II-5-2 Les différents lieux où s'expriment les incompatibilités.

II-5-2-a Le stigmate.

La plante est capable d'accorder ou le refuser du pollen lors de l'adhésion de celui-ci, lors de son hydratation et lors de la pénétration des tubes polliniques dans les premiers millimètres du stigmate (Herrero et Dickinson, 1980 ; Kahm et De masson, 1986).

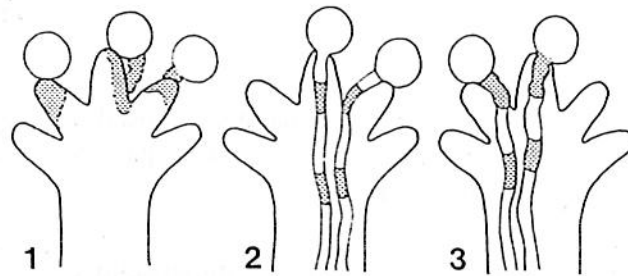
Les exsudats contiennent selon Knox *et al.* (1986), des carbohydrates, des protéines et généralement des polyphénols et des gouttelettes lipidiques. Synthétisées et excrétées par le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et leurs vésicules respectives ; ces protéines (enzymes et peroxydases) seraient aptes à permettre la reconnaissance, l'adhésion et l'hydratation. Ces enzymes de petite taille moléculaire formeraient une pellicule stigmatique où certaines molécules s'associeraient avec des glycoprotéines.

L'adhésion dépend du nombre de charges de la surface stigmatique, le pollen ayant une exine chargée positivement, le stigmate devra être plus ou moins chargé négativement (Dumas et Gaude, 1981). Pour Knox *et al.* (1986), l'adhésion dépend en outre de la β -galactosidase, enzyme qui diffuserait à travers les parois de l'exine à partir du cytoplasme du pollen. Dumas et Gaude (1981), décrivent un processus analogue à la réaction ligand-récepteur entre des C.A.M. (Cell Adhesion Molecules) agissant sur des récepteurs membranaires tels que des oligosaccharides de glycoprotéines et glycolipides. Une enzyme à activité estérasique non spécifique et des points d'attache dans les cryptes de l'exine (tryphine, ou autres glycoconjugués) ont été proposés, mais les études sont en cours et d'autres molécules sont de bons candidats.

Par contre la reconnaissance se ferait probablement grâce à des glycoprotéines, bien que encore une fois les C.A.M. semblent pour Dumas et Gaude (1981) être des molécules ayant aussi des caractères de molécule de reconnaissance.

L'hydratation suivrait ensuite un processus de reconnaissance moins complexe, puisqu'il reposerait principalement sur une simple compatibilité osmotique entre le pollen et le stigmate. Dumas et Gaude précisent en 1981 que les inhibitions stigmatiques (typiques des pollens tricellulaires) sont essentiellement restreintes aux plantes ayant des stigmates de type sec. Ce qui exclurait l'*Alpinia*, qui présente des stigmates de type humide (Perricaud, 1996).

Cependant même si le grain de pollen est accepté, il lui faudra émettre un tube pollinique.



Diagrammatic representation of compatible and self-incompatible crosses. A—Gametophytic self-incompatibility. B—Sporophytic self-incompatibility. C—Diagrams of the stigma callose response in *Brassica*, with Callose deposition indicated by stippling. 1, self-incompatible pollination; 2, compatible pollination; 3, self-incompatible pollination after treatment with 3% carbon dioxide. D—Heteromorphic self-incompatibility.

Fig. 13.- Les différents types d'incompatibilité. Selon Knox *et al.* (1986).

Et là encore dans le cas de croisement incompatible, le tube pollinique présentera une croissance aberrante en spirale, qui sera suivie d'un dépôt de callose du style sous le grain. Ce dépôt est très fréquent dans le phénomène d'incompatibilité sporophytique (Fig. 15 [D]). Ce dépôt correspond à une réaction défensive de la part du pistil. En effet Llugany *et al.* (1994), ont montré que le dépôt de callose est corrélé à la présence d'aluminium, agent toxique pour la plante, mais cette callose est aussi produite lors d'attaques fongiques, bactériennes (Knox *et al.*, 1986). Dans le cas du pollen la sécrétion de callose se produira si les membranes du stigmate et paroi du pollen sont incompatibles, la molécule de reconnaissance serait alors la concanavalinA (conA). Si les sites conA sont occupés il y a inhibition de la pénétration des tubes polliniques.

Des moyens pour surpasser ce rejet ont été mis au point par l'expérimentateur. Il peut s'agir par exemple de l'utilisation de pollen compatible mort ou irradié (qui aura donc une vélocité plus ou moins défailante), suivie du dépôt du pollen sain voulu qui par conséquent n'aura plus les barrières d'incompatibilité à franchir.

II-5-2-b Le style.

Les tubes polliniques quand ils ont réussi à franchir les deux premières barrières (adhésion et hydratation), doivent franchir le style. Or celui-ci possède un système de reconnaissance très sélectif. Cette étape permet la régulation et même l'arrêt des tubes polliniques incompatibles. Cette incompatibilité de type gamétophytique est réalisée par des glycoprotéines associées à des productions d'allèles du locus S, situé dans les cellules de transmission et surtout dans la partie basale du style et dans les ovaires (Knox *et al.*, 1986).

Le style sert aussi de lien de transmission de signaux électrochimiques entre les tubes polliniques et les ovules. Ces signaux participeraient à la mise en place d'une réaction de rejet des tubes polliniques dans le cas de pollinisations incompatibles (Knox *et al.*, 1986). Ce type de barrière peut à l'heure actuelle être surmonté par l'utilisation d'hormones de reconnaissance, ou encore par greffage de style compatible avec le pollen que l'on veut déposer, ainsi le pollen ne sera plus arrêté par ces incompatibilités gamétophytiques du style ou même sporophytiques du stigmate.

II-5-2-c Les ovules.

Le sac embryonnaire est protégé par plusieurs couches de cellules périphériques, celles du nucelle et des téguments de l'ovule. Pour beaucoup d'espèces, c'est souvent au niveau du micropyle que les tubes polliniques pourront présenter un arrêt de croissance qui pourrait être dû à des messagers chimiques au sein des ovaires dans le cas de *Salspiglossis* (Hepher et Boulter, 1987). Ce type de reconnaissance est le même que dans le cas de celui du style, sauf qu'il y a changement de site d'expression du locus S, il s'agit donc encore d'une incompatibilité de type gamétophytique. Reprenons pour exemple la fusion des cellules génératives, la cellule centrale et l'oosphère qui se fera par l'intermédiaire de protéines membranaires (cf. **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE II-4-3 Fécondation.**)

II-5-3 Effets des phénomènes de compatibilité et d'incompatibilité sur la morphologie des tubes polliniques.

Les travaux de Kahm et De Masson (1986), décrivent bien les différents traits morphologiques caractéristiques des phénomènes de compatibilité ou d'incompatibilité induits par les différents processus décrits ci-dessus.

L'étude de ces caractéristiques se révèle précieuse puisqu'elle va permettre de caractériser le type de relation qu'il peut exister entre le pollen « A » et un pistil « B ».

Ainsi, alors que des tubes polliniques se développant dans un pistil compatible seront dit

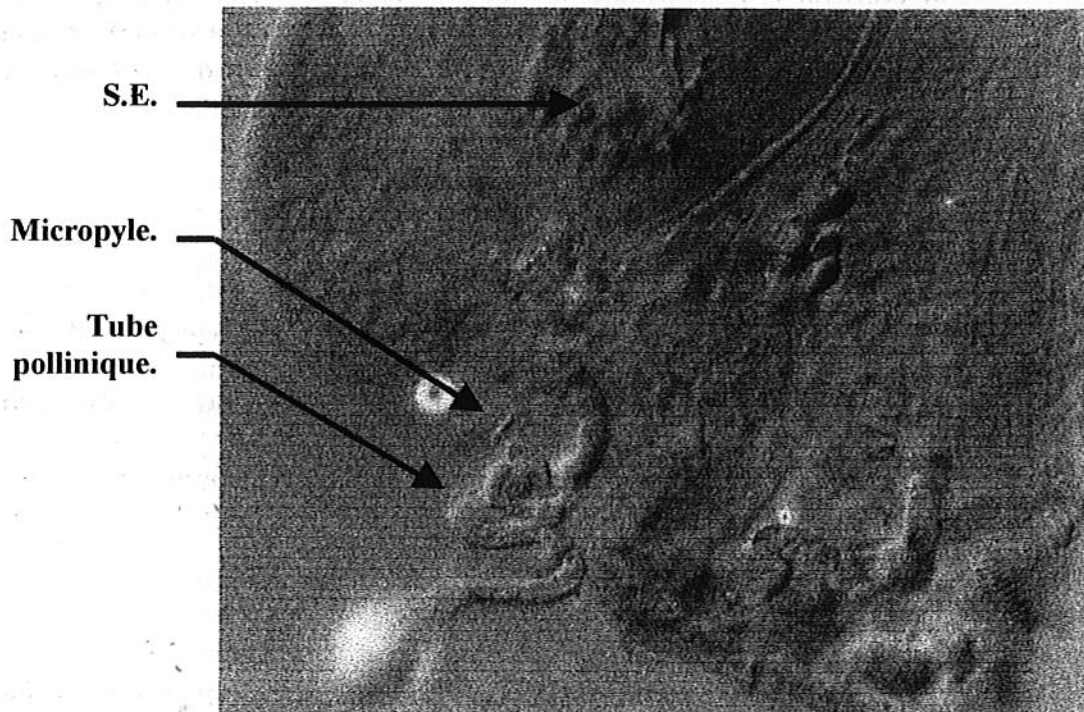


Photo 5.- t.p. présentant les caractéristiques d'une incompatibilité, obtenu avec un croisement R x r, stade 24 h. (cf. II-3 Observation des sacs embryonnaires grâce au contraste interférentiel.)(x 20).

« normaux » : tubes polliniques droits à paroi mince à leur extrémité et avec des tampons de callose régulièrement espacés ; les tubes polliniques incompatibles seront dit « anormaux ». Les traits morphologiques de tubes les plus souvent représentés par des croisements incompatibles apparaissent trois jours après la pollinisation. De tels t.p. se caractérisent par :

- une accumulation de callose au sommet du tube,
- un sommet du tube effilé voire même éclaté,
- dépôt de callose irrégulier,
- tubes polliniques spiralés (Photo 5).

Cette description complète donc celle de Linkens et Esser (1957), qui décrivaient sur *Pétunia* des tubes polliniques produisant plus de callose sur les croisements incompatibles que sur les croisements compatibles.

Ces caractères morphologiques particuliers sont des réponses à l'action des tissus environnants selon Knox *et al.* (1986). En effet le dépôt de callose est une réponse de défense à une agression extérieure (cf. **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE II-5-2-a** Le stigmate.), on peut émettre l'hypothèse que le tube pollinique essaierait de se défendre du pistil qui exerce une action de rejet sur ce pollen incompatible.

II-5-4 Les chromosomes et l'incompatibilité.

Si les fécondations interspécifiques peuvent être stoppées par de simples barrières osmotiques au niveau du stigmate (cf. **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE II-5-1** Quelques définitions.), elles peuvent aussi être évitées par un nombre de chromosomes différent entre les espèces croisées, voir même au sein de l'espèce.

II-5-4-a Variabilité interspécifique du nombre de chromosomes de base.

La diversité génétique au sein des *Zingiberacées* est grande, l'observation des nombres chromosomiques de base en sont la preuve :

X=10 pour le genre *Mantisia* (Datta et Sarkar, 1980), le genre *Zingiber* a un nombre de base de X=11 (Ratnambal et Nair, 1982 a), le nombre de base peut aussi être 16 pour *Globba*, 17 *Hedichium*, et X=12 pour *Alpinia*.

A l'heure actuelle les croisements interspécifiques présentent de grands intérêts pour l'amélioration des plantes, pour obtenir des sujets dont la résistance aux pathogènes et la part en huiles essentielles sont accrus (Jovanka *et al.*, 1995). Mais même si les plantes possèdent le même nombre de chromosomes, le croisement interspécifique est difficile et il sera d'autant plus difficile que le nombre de chromosomes entre les plantes est différent. Cependant les croisements interspécifiques ne sont pas impossibles (Singsit *et al.*, 1995). Le croisement interspécifique de plantes ayant des nombres de chromosomes différents (*Cyclamen persicum* $2n = 2x = 48$ et *Cyclamen purpuracens* $2n = 2x = 34$) permet l'obtention d'une descendance F_1 (avec $2n = 41$). Cependant ces hybrides H_1 capables de former du pollen viable sont incapables de générer des graines viables après un rétro-croisement avec *Cyclamen purpuracens* (Ishizaka H. et Uematsu J., 1995.).

II-5-4-b Variabilité inter et intraspécifique du degré de ploïdie.

La variabilité s'exprime aussi au travers des degrés de ploïdie qui s'obtiennent naturellement par doublement spontané du nombre de chromosomes lors de la méiose du microspore ou de la mégaspore ou artificiellement (Ratnambal et Nair, 1982 b). Cette variabilité chez *Pennisetum polystachion* est en fait une adaptation aux conditions environnementales selon Schmelzer et Renno (1997).

Cette diversité peut se manifester entre les espèces mais aussi au sein d'une espèce. Le *Clausena excavata* peut être naturellement tétraploïde, pentaploïde ou même hexaploïde, avec les mêmes caractères morphologiques et même chémotypes (diagrammes d'huiles essentielles). Mais cette différence entre les degrés de ploïdie peut conduire à la stérilité de la descendance. Prenons deux exemples :

- ✓ Au sein du genre *Clausena*, une fécondation entre un mégagamétophyte haploïde (A) et un microgamétophyte diploïde (B) conduira à la formation d'une descendance triploïde stérile (car elle a un degré de ploïdie impaire : triploïde dans notre cas). Cependant le croisement inverse semble pour le moment irréalisable (plante femelle tétraploïde x mâle diploïde) selon Froelicher Y., Orsay (Communication personnelle).
- ✓ Au sein d'un autre genre : *Citrus* (appartenant à la même famille : les rutacées) le croisement : femelle tétraploïde x mâle diploïde est majoritairement possible (Cameron et Soost, 1969 ; Harlan et DeWet, 1975), cependant des croisements femelle diploïde x mâle tétraploïde sont tout de même réussis (Starrantino et Reforgiato Recupero, 1981).
- ✓ Ces phénomènes sont principalement expliqués par deux théories :
 - Selon Knox *et al.* (1986), la **barrière postzygotique**, assure les rejets d'embryons issus d'une fécondation incompatible, selon une réaction entre les tissus de l'albumen et les tissus de l'embryon ayant des différences de niveau de ploïdie (cf. **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE II-5-1** Quelques définitions.). Un embryon sera viable quand le rapport des niveaux de ploïdie dans le zygote albumen fécondé et le zygote fécondé sera de 3/2.
 - La théorie de l'**EBN** (Endosperm Balance Number) : Selon Carputo *et al.* (1995), en effectuant des croisements avec des plantes tests on peut déterminer arbitrairement l'« endosperm balance number » (EBN). Le développement de l'albumen nécessite un rapport EBN des noyaux maternels : paternel de 2 : 1 au sein l'albumen (ce qui différencie cette théorie de la précédente). Pour effectuer un croisement avec succès il faut donc que les parents aient le même EBN quand ils produisent leurs gamètes. Dans le cas de *Solanum commersonii*, l'EBN est de 1 et l'hybride haploïde *Tuberosum* a un EBN de 2, il fallait donc doubler l'EBN de la plante utilisée comme femelle pour obtenir un nombre EBN de 2 (Carputo *et al.*, 1995).
- ✓ Explication apportée par la génétique fondamentale :

L'observation de la méiose de la descendance triploïde montre qu'elle a une mauvaise distribution des chromosomes et on obtient de grandes différences dans la taille des grains de pollen. Cependant le taux de pollen viable peut rester élevé, et des croisements sont envisageables mais au gré des grains de pollen formés lors de la méiose (peu de grains diploïdes sont formés). On obtiendra donc des zygotes à degrés de ploïdie variables (pairs ou impairs) ou des descendance ayant un nombre de chromosomes légèrement différent dites : **aneuploïdes** (Schultz-Schaeffer, 1985). En effet d'après Stebbins (1971), l'appariement dépend du degré d'homologie des chromosomes. Les chromosomes homologues s'apparient donc grâce à leur similarité de taille, arrangement des gènes entre eux sur le chromosome... Dans le cas d'autopolyploïdes (tous les chromosomes sont issus du même parent) les chromosomes s'apparient de façon correcte ; mais les chromosomes d'une plante peuvent aussi provenir de parents n'ayant que peu d'homologie (cas d'une allopolyploïdie ; et surtout des polyploïdes impaires) (Schultz-Schaeffer, 1985). Au quel cas lors d'une division l'appariement se fera mal et de nombreux chromosomes seront univalents, ou la formation de multivalents dérangera la répartition des chromosomes. De même, dans le cas de croisements interspécifiques les appariements de chromosomes peuvent s'effectuer, mais dans d'autres cas, les interactions disharmonieuses, dues au comportement indépendant de chromosomes homologues ou même le manque de certains, provoqueront la stérilité des hybrides.

II-6 Les techniques d'observations.

II-6-1 Germination *in Vitro*.

Il existe différentes techniques de germination *in vitro* :

- a) Technique de la goutte pendante, qui demande beaucoup de moyens techniques
- b) Culture sur milieu semi-solide.
- c) Culture en suspension, qui peut permettre une utilisation ultérieure du pollen germé.

Mais quelle que soit la technique la germination du pollen *in vitro* nécessite que le milieu de germination ait une composition qui se rapproche le plus possible de la composition de la sécrétion stigmatique de son espèce (Dafni, 1992).

Il est donc nécessaire d'apporter au milieu un agent osmotique et des substances nutritionnelles.

C'est pourquoi la germination *in vitro* suivra quelques conditions :

- ✓ Apport de saccharose, qui assure les deux fonctions décrites ci-dessus.
- ✓ Apport de calcium, qui servirait à modifier la charge membranaire à l'extrémité du pollen (Knox *et al.*, 1986).
- ✓ Apport d'acide borique, qui stimulerait la germination et rendrait le pollen moins sensible à des variations de pH selon Voyiatzi (1995).
- ✓ Une température comprise entre 20 et 30°C (les températures inférieures ralentissant la germination).
- ✓ Un éclairage approprié : dans le cas du riz un éclairage de 12 heures (donc en jours courts par rapport au champ 15 heures) permet une augmentation de la germination de 3 à 44 fois par rapport au pollen normal. La fertilité serait gouvernée par le phytochrome (Oard et Hu, 1995).

Les compositions entre les différents milieux de germination décrits dans la littérature varient grandement. Ainsi Voyiatzi (1995) affirme que l'ajout de nitrate de calcium au milieu de germination de *Rosa hybrida* inhibe la germination du pollen, alors qu'il semblait acquis que le calcium était un des composants primordial pour la germination de tout pollen.

Mais même si les conditions optimales sont toutes réunies pour la germination du pollen *in vitro*, ce dernier germera en fonction de son état. Bartz et Stöesser (1989), ont décrit cette différence de potentiel germinatif de chaque grain de pollen en fonction de leurs réserves respectives en amidon, lipides.

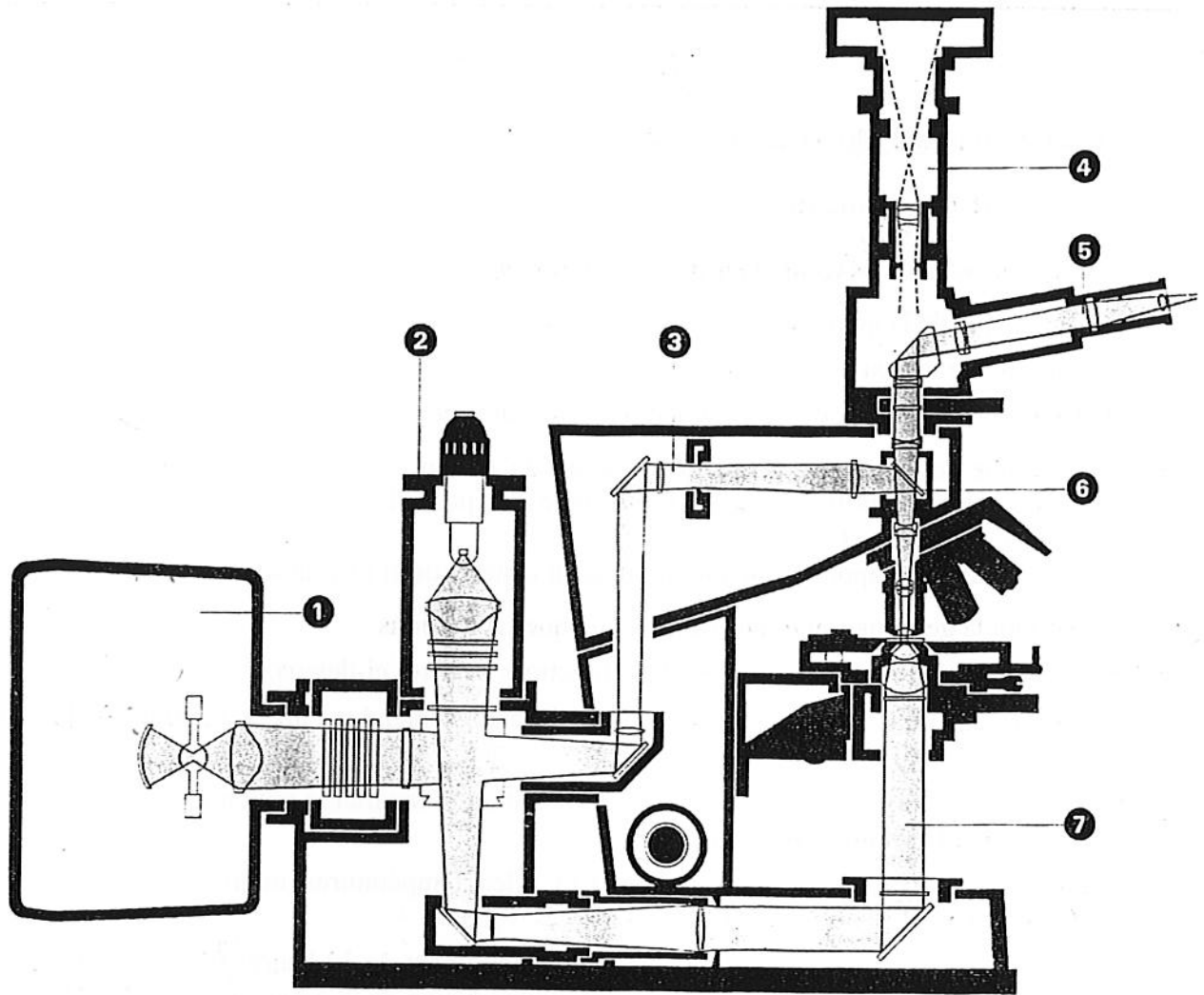


Fig. 14.- Le microscope à fluorescence. Selon Wastiaux (1994).

1 : Lampe de fluorescence HBO 202 et magasin de filtres associé ; 2 : Lampe 6 V/15 W ; 3 : Marche des rayons en lumière incidente ; 4 : Marche des rayons photographiques ; 5 : Marche des rayons d'observation ; 6 : Coulisse avec miroirs diviseurs dichromatiques ; 7 : Marche des rayons en lumière transmise.

II-6-2 La microscopie à épifluorescence.

II-6-2-a Principe.

La microscopie à épifluorescence est basée sur la propriété de certaines molécules de fluorescer, c'est-à-dire de transformer la lumière qu'ils reçoivent en radiations lumineuses de plus grande longueur d'onde, en l'occurrence pour l'œil humain, ce seront des rayonnements de longueur d'onde située dans le visible. La fluorescence ne se manifeste que pour des radiations excitatrices spécifiques d'une substance donnée (cf. fig. 16).

Le Bleu d'Aniline (aussi nommé Bleu coton, Bleu de chine, Bleu lumière) est un colorant faisant partie de la catégorie des phényl-méthane et plus exactement des triamino-triphényl méthanes de formule brute :



Martin (1958), affirme qu'après une chromatographie du bleu d'Aniline, on obtient différents composés : le fluorochrome (la molécule qui fluoresce est en fait invisible à la lumière du jour) qui est différent du pigment bleu qui donne la couleur au produit ; et encore un composé d'un jaune faible. Néanmoins, ce sont ces trois pigments associés qui nous permettrons l'observation sous épifluorescence de matériel végétal.

II-6-2-b Intérêt.

Le fluorochrome du bleu d'aniline autorise, sous lumière ultra-violette (de longueur d'onde de 334 à 365 nm), la mise en évidence des composés polysaccharidiques contenus en particulier dans les bouchons de callose (composés d'unités D-glucopyranose réunis par des liaisons β 1-3). Ces bouchons de callose, contenus dans les tubes polliniques et à l'intérieur même de la paroi des tubes, fluorescent en vert-jaune après traitement. Cette méthode d'observation associée à la technique du Squash. Le matériel étudié est macéré dans la soude pour permettre un écrasement facilité des tissus entre lame et lamelle, ce qui est aujourd'hui d'utilisation courante pour l'étude de la reproduction sexuée des végétaux (et principalement les phénomènes d'incompatibilité). Elle a été largement employée et reprise : Linkens et Esser (1957) ; Cerovic (1992) ; Cousin (1995)...

Bartz et Stöesser ont déclaré en 1989, que cette technique, qui est porteuse d'un grand intérêt est tout de même limitée car elle ne permet pas la localisation ni le comptage des tubes polliniques, mais permet d'évaluer précisément la croissance de ceux-ci. Ainsi, l'intérêt quantitatif d'une telle méthode est souvent mis de côté, car le comptage de tubes polliniques sous épifluorescence dans des tissus plus ou moins désorganisés est difficile (Cerovic, 1992). Cependant une méthode de comptage est envisageable avec l'association de l'épifluorescence et de coupes histologiques dans la paraffine (Bartz et Stöesser, 1989 ; Knox *et al.*, 1986 ; Kahm et De Masson, 1986).

Linkens et Esser (1957), Kahm et De Masson (1986), ont utilisé cette technique pour caractériser qualitativement le phénomène d'incompatibilité grâce au dépôt de callose dans les tubes polliniques. De même Stöesser et Anvari (1983), Postweiler *et al.* (1985), ont détecté une différence de fluorescence des ovules viables avec les ovules non viables.

Ainsi, cette technique apparaît aujourd'hui comme polyvalente et nécessaire pour l'étude de la progression des gamètes mâles au sein du pistil. Mais même si cette technique peut donner des résultats quantitatifs, ceux-ci devront être pris avec précaution étant donné la difficulté de comptage et de mesure.



A



B



C

Fig. 15.- Image obtenue au microscope interférentiel d'une coupe polie d'un acier au nickel chrome lors de l'étalement progressif des franges d'interférences. Selon Wastiaux (1994).

II-6-3 La microscopie à contraste interférentiel différentiel de Nomarski.

II-6-3-a Principe du contraste interférentiel.

La microscopie par interférences, permet l'observation de cellules vivantes sans coloration et dans leur milieu naturel. Un microscope interférentiel a des écartements des franges (Fig. 17 [A et B]) d'interférences réglés de telle sorte que le champ visuel apparaît parfaitement homogène : autrement dit les franges d'interférences responsables du contraste interférentiel sont infiniment étalées (fig. 17 [C]). Ceci a pour but de transformer les différences de marche en différence d'éclairement selon Wastiaux (1994).

II-6-3-b Contraste interférentiel différentiel.

Wastiaux (1994), explique que pour des raisons techniques le contraste interférentiel ne peut être utilisé avec des objectifs puissants, puisque le plan focal se trouverait alors dans l'objectif.

Le prisme de Nomarski, a résolu ce problème en accolant les deux prismes en cristal biréfringent uniaxe, de telle manière qu'on obtienne un déplacement hors du prisme du plan de localisation d'interférence. Ce qui permet donc de placer le prisme à un intervalle relativement grand de l'objectif tout en amenant les franges d'interférences dans le plan focal de l'objectif.

Cette nouvelle technique nous permet donc d'étudier à fort grossissement des tissus ou des cellules vivantes. Ces observations ne nécessitent pas de préparations. Ainsi cette méthode évite un écrasement des tissus, donc leur désorganisation et autorise une observation plan par plan de la préparation (Jahier *et al.*, 1992).

Tableau VII - Composition du colorant d'Alésia :

10 ml	Ethanol
1 ml	Vert de malachite (à 1 % dans de l'éthanol à 95°)
30 ml	Eau distillée
25 ml	Glycérol
5 ml	Fuchsine acide (à 1 % dans l'eau)
0,5 ml	Orange G (1 % dans l'eau)
1 à 4 ml	Acide acétique glacial
2 g	Phénol
2 g	Chloral hydraté

MATERIEL ET METHODES

Tableau VIII - Composition du milieu de germination :

100 ml	10 % (v/v)	Eau asp.
10 g	100 ppm	Saccharose
1 mg	100 ppm	KNO_3
20 mg	200 ppm	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
10 mg	100 ppm	H_3BO_3
30 mg	300 ppm	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$

pH=5,2

d'après les études menées par Perricaud (1996)

Tableau VII.- Composition du colorant d'Alexander :

Ethanol	10 ml
Vert de malachite (à 1 % dans de l'éthanol à 95°)	1 ml
Eau distillée	50 ml
Glycérol	25 ml
Fuschine acide (à 1 % dans l'eau)	5 ml
Orange G (1 % dans l'eau)	0,5 ml
Acide acétique glacial	1 à 4 ml
Phénol	5 g
Chloral hydraté	5 g

MATERIEL ET METHODES

Tableau VIII.- Composition du milieu de germination :

		Soit dans 100 ml
Ca(NO ₃), 4 H ₂ O	300 ppm	30 mg
H ₃ BO ₃	100 ppm	10 mg
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	200 ppm	20 mg
KNO ₃	100 ppm	1 mg
Saccharose	10 % (v/v)	10 g
Eau qsp		100 ml

pH=5,2

d'après les études menées par Perricaud (1996).

I MATERIEL VEGETAL.

Le matériel végétal se compose d'une parcelle d'*Alpinia* âgée de 3 ans et située en plein champ. Les plantes cultivées pour ces études étaient l'*Alpinia purpurata* rouge, le rose et l'*Alpinia sanderae*. Aucun soin particulier ne leur était apporté sauf un désherbage tous les mois, une fumure d'entretien tous les trois mois et un arrosage par aspersion à volonté.

De plus, trois pieds d'*A. purpurata* rouge, rose et *A. sanderae*, ont été transplantés trois semaines avant les manipulations. Ils étaient cultivés en pots avec un substrat de pouzzolane pour faciliter le prélèvement de racines. Ceux-ci étaient placés sous abri et étaient arrosés avec de l'eau courante.

Pour les études de germination *in situ* et d'observations de sacs embryonnaires, des pollinisations ont été effectuées. Lors des croisements, les fleurs utilisées comme femelles étaient des fleurs d'*A. purpurata* rouge.

II METHODES.

II-1 Test de viabilité d'Alexander.

L'observation de la viabilité a été effectuée avec du pollen prélevé lors de la déhiscence des anthères (mais elle est aussi possible avec des anthères immatures) et coloré par la solution d'Alexander (Maizonnier, 1992) (Tableau VII).

Le prélèvement des fleurs sur la parcelle d'*Alpinia* était faite le matin. Le pollen était extrait à l'aide de pinces fines qui étaient nettoyées à l'alcool entre chaque nouvelle fleur pour éviter toute contamination par du pollen étranger. Le pollen extrait était déposé sur des lames (si possible 2 à 3 lames différentes) et le colorant était ajouté quelques minutes avant l'observation. Le pollen, qui était aggloméré, était alors dispersé à l'aide des pinces jusqu'à ce qu'aucun amas ne soit visible.

L'observation et les comptages de pollen ont été réalisés grâce à un microscope optique Olympus BH-2 à l'objectif X20. Les pollens colorés en vert étaient comptés comme stériles car seules leurs parois étaient colorées par le vert de malachite.

Les pollens colorés en rose-violacé étaient comptés comme fertiles, puisque leurs protoplasmes étaient alors colorés par la fuschine acide et l'Orange G (Photo 6, annexe 9). Le taux de viabilité était alors exprimé en pourcentage de grains viables sur le nombre total de grains comptés (en moyenne 200 grains de pollen étaient observés par lame).

I-2 Germination *in vitro*.

La germination *in vitro* et le test de viabilité par la méthode d'Alexander étaient effectués simultanément : le pollen de chaque fleur était donc partagé pour le test de viabilité et la germination *in vitro*. Cette manipulation permettait le comptage de pollen qui étaient germés lors de l'observation. C'est pourquoi le milieu de germination devait contenir tout ce qui est nécessaire à la germination du pollen. Le milieu de germination idéale devait donc se rapprocher le plus possible de la sécrétion stigmatique (Tableau VIII).

Le prélèvement des fleurs s'effectuait le matin de 8 à 10 heures. Le prélèvement de pollen se faisait sur les fleurs à l'anthèse à l'aide d'une pince désinfectée à l'alcool pour chaque fleur (on évitait ainsi toute contamination par du pollen étranger ; le pollen était déposé sur des lames et y

- Fixation : éthanol acétique (3 : 1) pendant 24 h à température ambiante.
- Macération : soude 8 M pendant 12 h à température ambiante.
- Rinçage : eau ordinaire pendant 4 h pour éliminer toute trace de NaOH.
- Coloration au bleu d'aniline 3 % dans K_3PO_4 à 0,1M pendant 3 h à température ambiante.
- Montage : dans une goutte de bleu d'aniline 2 % dans K_3PO_4 à 0,1M, écraser le pistil sur une lame. Après avoir recouvert d'une lamelle, observer au microscope à fluorescence.

Fig. 18.- Protocole de coloration pour l'observation sous microscope à fluorescence.

était rajouté le milieu de germination. Le pollen était dispersé dans le liquide pour permettre une observation et des comptages plus aisés ; les lames étaient ensuite déposées dans des boîtes de Petri équipées d'un tapis cotonneux humide et le tout était fermé, dans une chambre humide à température ambiante et à la lumière, pendant 4 heures. L'observation et les comptages de pollen étaient réalisés grâce à un microscope Olympus BH-2 à l'objectif X20. Tout pollen, qui à l'observation, possédait un tube pollinique d'une longueur au moins égale au diamètre du grain de pollen était considéré comme germé (Photo 7, annexe 9).

Le pourcentage de germination était défini par le nombre de grains de pollen germés sur le nombre total de grains de pollen observés. En moyenne 150 grains étaient observés par lame.

II-3 La germination et croissance des t.p. *in situ* – Viabilité des ovules.

Les fleurs utilisées pour cette étude étaient encore issues de la même parcelle de culture que les fleurs utilisées pour les études précédentes.

Des croisements étaient effectués le matin sur des fleurs à l'anthèse à l'aide d'un crayon de bois désinfecté à l'alcool à chaque croisement pour éviter toute contamination par un pollen étranger. Les fleurs étaient ensuite marquées à l'aide d'une étiquette. Tous étaient effectués en double, donnant ainsi la possibilité de prélever une fleur pollinisée pour l'observation et une autre restait en place comme témoin pour examiner son évolution sur le terrain. (cf. **RÉSULTATS II RÉSULTATS DE LA SECONDE ÉTUDE [OBSERVATIONS EFFECTUÉS SOUS FLUORESCENCE]**).

Le prélèvement des fleurs se faisait 24 h après. La fleur était décortiquée afin de ne garder que le stigmate, le style et l'ovaire. L'ovaire lui-même était décortiqué, au scalpel, pour obtenir lors de l'écrasement des tissus, un meilleur étalement et une meilleure observation des tubes polliniques.

La viabilité des ovules était appréciée sur des ovules prélevés à partir de fleurs non pollinisées et d'âges différents.

L'observation était effectuée à l'aide de deux techniques de colorations :

- La première décrite par Dumas et de Vaulx en 1992 a été infructueuse : la callose restait incolore à l'observation.
- La seconde faisait appel à la méthode de coloration décrite ci-contre (Fig. 18).

La fixation, la macération et la coloration s'effectuaient sous hotte aspirante. Les rinçages étaient effectués par renouvellement de l'eau de rinçage environ toutes les 30 min. Enfin l'écrasement se faisait lors du dépôt de la lamelle que l'on tapait à l'aide d'un embout arrondi. Ainsi, avec un peu d'expérience des écrasements permettant de bonnes observations sans trop d'artefacts ou de bulles d'airs était obtenus (Photo 8, annexe 10). L'observation était réalisée avec un microscope de type : Ernst Leitz Wetzlar GMBH

Type 020-437.035

Longueur d'onde utilisée : 334-365 nm.

Le microscope était équipé d'un appareil photographique Wild Photomat MPS45 avec le corps de chambre MPS51 et le châssis à moteur pour film 24 x 36. Le film était une pellicule 400 ASA Kodak gold ultra.

- Formol (=Formaldéhide)	5 volumes
- Acide propionique	5 volumes
- Ethanol 50 %	90 volumes

Fig. 19.- Composition du liquide de fixation (mélange FPA).

- Acide lactique	10 ml
- Hydrate de chloral	10 g
- Phénol	10 g
- Essence de girofle	10 ml
- Xylène	5 ml

Fig. 20.- Composition du liquide de Herr.

- ✓ Fixation : alcool (100 %) / acétique (100 %) 3 / 1 pendant 13 heures
- ✓ 3 Rinçages de 5 min à l'eau distillée
- ✓ Hydrolyse à l'acide chlorhydrique 5 M à température ambiante pendant 45 min. Elle est utile pour la dissolution des composés pectiques de la lamelle moyenne et permet aussi l'éclaircissement du cytoplasme; de plus l'acide chlorhydrique libère les groupements aldéhydiques des sucres de l'ADN par destruction de la liaison entre la base purique et le désoxyribose.
- ✓ Hydrolyse au HCl 1 M à température ambiante pendant 10 min.
- ✓ Digestion à température ambiante, par des pectinases 2 % dans de l'eau distillée à pH acide pendant 45 min.
- ✓ - 3 Rinçages de 5 min à l'eau distillée
- ✓ Coloration au réactif de Schiff à l'obscurité pendant 2 h. La technique de Feulgen permet la coloration de l'ADN par fixation des molécules colorantes aux groupements aldéhydiques libérés lors de l'hydrolyse. Les chromosomes deviennent alors rouge-violacé.
- ✓ Montage dans le carmin acétique des apex racinaires, dépôt de la lamelle et écrasement par tapotements soutenus et par pression forte et constante des doigts sur la lame. Après un lutage, les lames peuvent se conserver quelques jours au congélateur.

Fig. 21.- Protocole de coloration des racines pour le comptage chromosomique.

II-4 Observations des ovules et sacs embryonnaires grâce au contraste interférentiel différentiel.

Les croisements étaient effectués le matin, sur la parcelle d'*Alpinia*, sur des fleurs à l'anthèse. Les fleurs étaient ensuite marquées à l'aide d'une étiquette (cf. **RÉSULTATS III OBSERVATION DES SACS EMBRYONNAIRES GRACE AU CONTRASTE INTERFERENTIEL.**).

Une décoloration des ovaires a été effectuée pour permettre une observation en profondeur. Ainsi après le prélèvement on ne gardait de la fleur que l'ovaire que l'on coupait transversalement en quatre quartiers pour une meilleure pénétration des produits. Les ovaires étaient ensuite placés dans des tubes eppendorf pour l'étape de fixation. La fixation se faisait par trempage pendant 24 h des ovaires dans un mélange FPA (Fig. 19).

La fixation terminée, les tubes étaient vidés pour permettre l'introduction du décolorant (liquide de Herr). Un trempage de 2 à 3 semaines à température ambiante suffisait pour l'éclaircissage des tissus (Fig. 20).

Le montage pour l'observation nécessitait de retirer un par un les ovules sous une loupe et de les déposer avec du liquide de Herr sur la lame d'observation. Pour éviter l'écrasement des ovules, deux lamelles étaient collées à l'aide de colle de dissolution sur la lame et servaient de support à la troisième lamelle recouvrant les ovules déposés dans le sillon entre les deux premières lamelles (Photo 9, annexe 10). Les observations nécessitaient l'utilisation d'un microscope Olympus BH-2 équipé pour observation en contraste interférentiel différentiel (dite de Nomarski). Les photos ont été prises grâce à un appareil olympus C-35AD-4 disposé sur l'adaptateur PM-10ADS et associé au photomat Olympus AD exposure control unit.

Les pellicules utilisées étaient des TMAX 400 pro de 200 ASA en noir et blanc.

II-5 Comptage de chromosomes.

- ✓ Les plantes en pots étaient arrosées 30 mn avant le prélèvement pour déclencher une phase active de divisions mitotiques. L'arrosage était effectué à 14^h (heure la plus favorable pour déclencher une phase mitotique chez *Alpinia purpurata* (Péto, communication personnelle).
- ✓ Le prélèvement était fait 30 minutes après. Des extrémités de racines de 1 cm étaient prélevées à l'aide d'un scalpel. Les racines étaient mises aussitôt dans des pots annotés avec de l'eau selon leur espèce et leur variété. Après un rinçage, les racines étaient placées dans une solution saturée d'alpha bromonaphtalène (100 ml de Bromonaphtalène pour 10 ml d'eau).
Le Bromonaphtalène permet de contracter les chromosomes et il empêche la formation du fuseau mitotique et arrête donc les cellules en division à la métaphase.
Ce prétraitement à l' α bromonaphtalène permettait d'avoir un grand nombre de cellules en métaphase après ce prétraitement d'une durée de 3 à 5 heures (Fig. 21 et photo 10, annexe 11).

Les observations étaient effectuées sur microscope Olympus BH-2 avec un filtre bleu KB-t qui servait à augmenter le contraste et avec le microscope :

Ernst Leitz Wetzlar GMBH

Type 020-437.035 avec le filtre bleu KB-t. Ce dernier était équipé pour prendre les photos du Wild Photomat MPS45 avec le corps de chambre MPS51 et le châssis à moteur pour film 24 x 36. Le film était une pellicule 400 ASA Kodak gold ultra.

RESULTATS

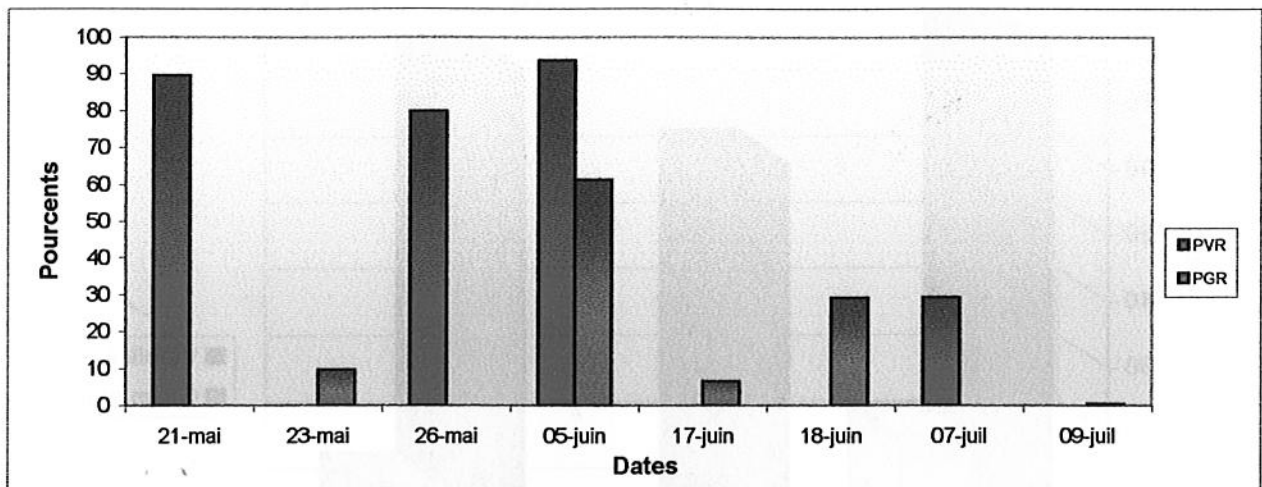


Fig. 22.- Pourcentages de la viabilité (PVR) et de germination (PGR) du pollen d'*Alpinia* rouge

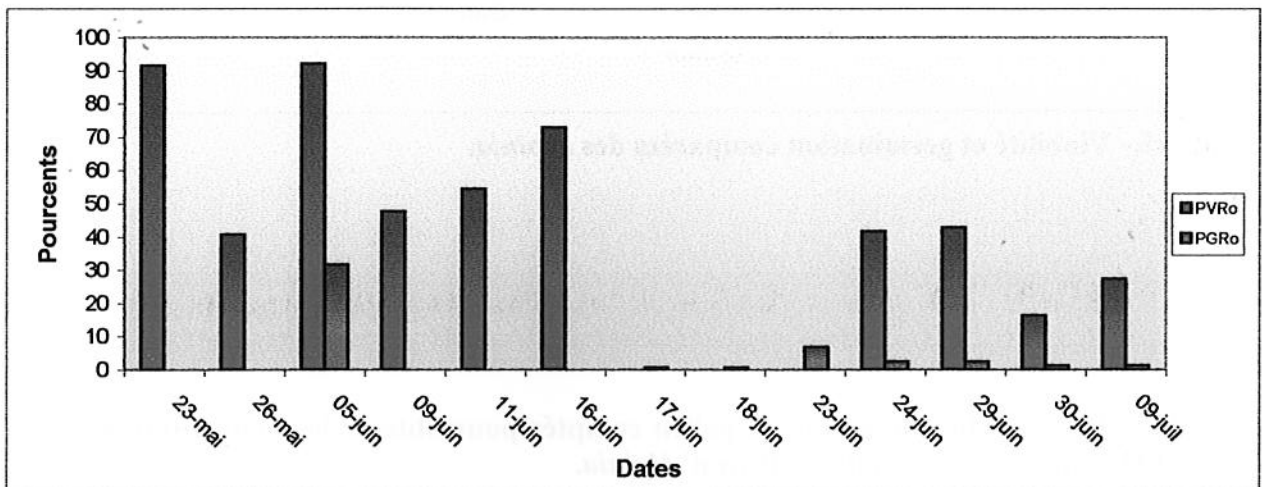


Fig. 23.- Pourcentages de la viabilité (PVR₀) et de germination (PGR₀) du pollen d'*Alpinia* rose

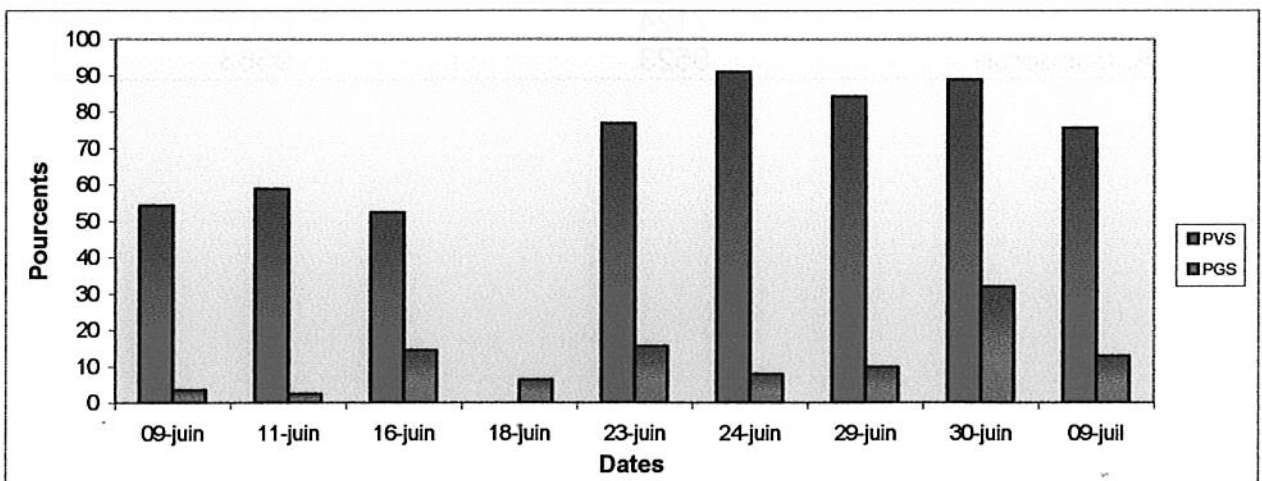


Fig. 24.- Pourcentages de la viabilité (PVS) et de germination (PGS) du pollen d'*Alpinia* sanderae

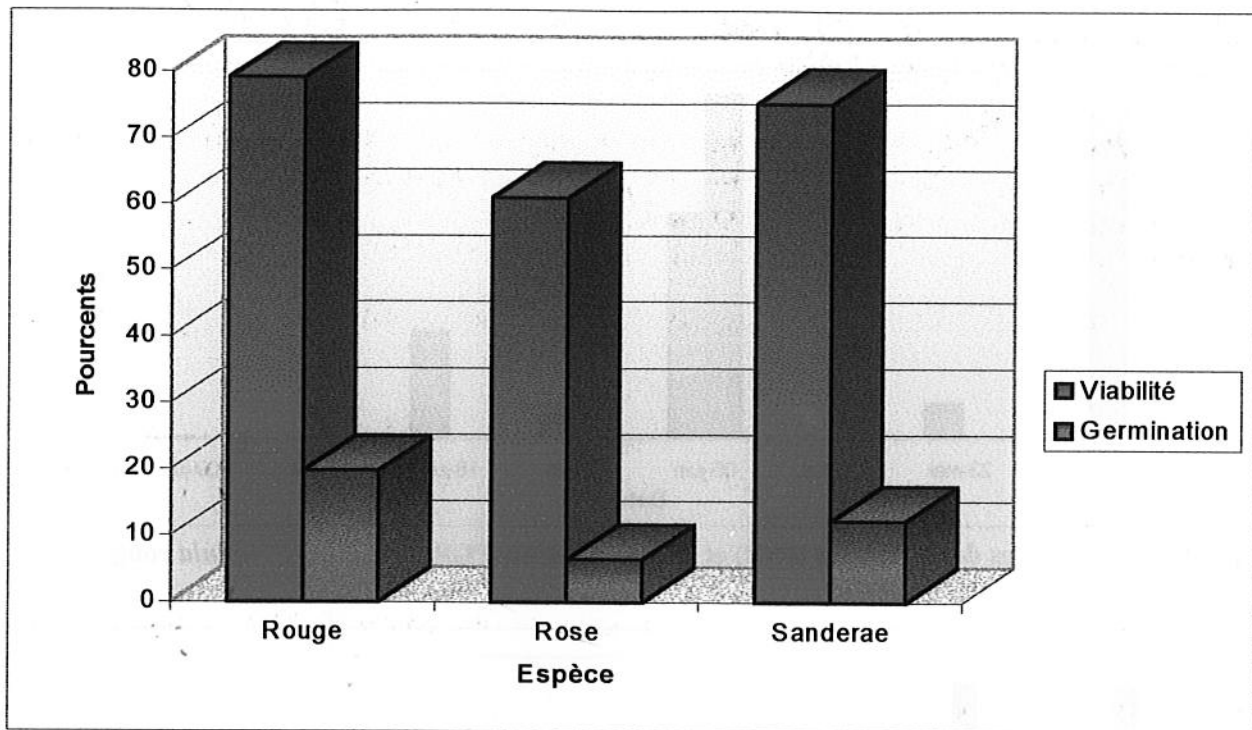


Fig. 25.- Viabilité et germination comparées des *Alpinia*.

Tableau IX.- Nombre de grains de pollen comptés pour obtenir les pourcentages de viabilité et de germination des pollens d'*Alpinia*.

	Viabilité	Germination
A.p Rouge	6933	6003
A.p. Rose	7124	12157
A. Sanderæ	9523	9563

I RÉSULTATS DE LA PREMIÈRE ÉTUDE (TESTS D'ALEXANDER ET DE GERMINATION *IN VITRO*).

De grandes variations de la germination dans le temps ont été observées et ceci qu'il s'agisse des pollens d'*A. purpurata* ou *sandereae* (Fig. 22 à 24 p. 23 et tableau IX)

Une tendance est révélée sur la période d'expérimentation :

il s'agit d'une baisse de la germination *in vitro* du pollen d'*A. purpurata* :

- ✓ rouge (d'un pourcentage de germination de 9,5 à 0,135 (Fig. 22)),
- ✓ rose (de 31,66 à 1,2 (Fig. 23)).

Ces résultats sont en accord avec les résultats du test de viabilité. En effet on observe une diminution de la viabilité du pollen de la variété rouge de 89,61 % à 29,3 % (Fig. 22). De même la viabilité du pollen de la variété rose chute d'un pourcentage de viabilité de 91,54 % à 27,39 % (Fig. 23).

Cependant on observe aussi une augmentation de la viabilité et de la germination de l'*Alpinia sandereae*.

En effet nous observons une augmentation du :

- ✓ pourcentage de germination *in vitro* de respectivement : 3,3 à 12,8 % (Fig. 24).
- ✓ pourcentage de viabilité 54,24 à 75,64 % (Fig. 24)

D'autres part en se référant à la fig. 25, nous constatons que globalement, nous avons des pourcentages de viabilité pour les trois plantes situés entre 61 et 82 %. Les résultats de germination sont eux beaucoup plus bas puisqu'ils sont compris dans la fourchette de 6,4 à 19,8 %. Ces résultats étant la moyenne de résultats issus des expérimentations effectuées entre le 21/05/97 et le 09/07/97, et des comptages effectués l'année précédente.

II RÉSULTATS DE LA SECONDE ÉTUDE (OBSERVATIONS EFFECTUÉS SOUS FLUORESCENCE).

L'expérimentation se divise en deux parties :

-La première avait pour but de comparer des fleurs non pollinisées brévistyles et longistyles ; d'estimer la viabilité des ovules.

-La seconde comportait différents croisements permettant de caractériser trois phénomènes différents :

- ✓ 1^{ère} série de croisements :

Cette série permettait de comparer la germination et la croissance *in situ* des t.p. pour les croisements inter et intraspécifiques.

Croisements : R x R : Autopollinisation stricte, une fleur d'*Alpinia* rouge était autopollinisée.

R x r : Pollinisation intraspécifique, une fleur d'*Alpinia* rouge était pollinisée par du pollen d'*Alpinia* rose.

R x S : Pollinisation interspécifique, une fleur d'*Alpinia* rouge était pollinisée par du pollen d'*Alpinia sandereae*.

✓ 2^{ème} série de croisements :

Cette seconde série avait pour but de comparer ces fécondations et d'établir si la plante était préférentiellement une plante à autopolinisation stricte ou non stricte.

Croisements : $R_1 \times R_1$:	Autopolinisation stricte.
$R_1 \times R_2$:	Autopolinisation non stricte, le pollen d'une fleur A était utilisé pour polliniser une autre fleur mais appartenant à la même inflorescence.
$R_1 \times R_3$:	Autopolinisation non stricte, le pollen de la même fleur A était utilisé pour polliniser une fleur sur une autre inflorescence appartenant à des plantes de même souche (issues d'une même plante mère par division végétative)

✓ 3^{ème} série de croisements :

Cette dernière série effectuée lors de manque de matériel végétal permettait de comparer les autopolinisations aux allopollinisations et déterminer s'il existait des différences entre-elles.

Croisements : $R_{11} \times R_{12}$:	Autopolinisation non stricte, le pollen de la fleur était utilisé pour polliniser une autre fleur mais appartenant à la même inflorescence.
$R_{21} \times R_{22}$:	Autopolinisation non stricte, le pollen d'une fleur était utilisé pour polliniser une fleur sur une autre inflorescence appartenant à des plantes de même souche (issues d'une même plante mère par division végétative).
$R_{31} \times R_{32}$:	Allopollinisation, le pollen d'une fleur était utilisé pour polliniser une fleur sur une autre inflorescence appartenant à des plantes de souches différentes

II 1 Fleurs longistyles et brévistyles.

Dans plus de 91 % des observations de fleurs longistyles, la présence de pollen sur les stigmates ou de tubes polliniques dans les styles n'ont pas été observées. Seule une observation a révélée un t.p. dans les tissus du style !

Dans le cas des fleurs brévistyles 77 % des fleurs présentent du pollen sur les stigmates dont 50 % présentent un grand nombre de tubes polliniques dans le style (formation de faisceau de t.p. épais). Pour 38 % des observations, nous avons de nombreux tubes polliniques dans les ovules, et dont 40 % ont une répartition dans les ovaires « homogène » (cf. Définitions). Nous avons souvent observé des introductions de tubes polliniques dans les micropyles.

Tableau X.- Fluorescence des ovules de fleurs non pollinisées mesurée après coloration au bleu d'aniline.

	Caractéristiques	Pourcentage d'observations.
Témoin ¹	Nucelle fluorescent S.E. plus fluorescent que le nucelle	100
Bouton jeune	Nucelle aussi fluorescent que le nucelle du témoin. S.E. moins fluorescent que le témoin	100
Bouton floral	S.E. aussi fluorescent que le témoin Nucelle moins fluorescent que le témoin	100
Fleur à l'anthèse	Nucelle plus fluorescent que le bouton S.E. plus fluorescent que la fleur de 72 h ^b	25
	Nucelle plus fluorescent que le bouton S.E. aussi fluorescent que le témoin	25
	Nucelle plus fluorescent que le bouton S.E. plus fluorescent que le témoin	50
Fleur de 48 h	Nucelle plus fluorescent que le témoin S.E. moins fluorescent que le témoin	100
Fleur de 72 h ²	Nucelle aussi fluorescent que le témoin	25
	Nucelle peu fluorescent (comme pour les boutons)	50
	Nucelle plus fluorescent que le témoin	25

¹: Le témoin est une fleur prélevée au stade 24 h.

²: 50 % des ovules issus de fleurs de 72 h ont leur sac embryonnaire plus fluorescent que le témoin.

Tableau XI.- Comportement du pollen mesuré avec les croisements R x R.

Nombre de grains de pollen sur les stigmates	Classes de fréquences		
	Nombreux (>50)	~20 à 50 grains	Pas de grains
	62 %	18 %	20 %
Germination <i>in situ</i>	Bonne (>75%)	Mauvaise	
	74 %	26 %	
Visibilité de la Callose ¹	Callose bien visible	Callose peu visible	
	52 %	48 %	
Comportement des tubes polliniques	Arrêt à l'arrivée des ovaires	Pas d'arrêt observé	
	75 %	25 %	
Comportement du faisceau de tubes polliniques dans le style	Baisse du diamètre du faisceau	Diminution du nombre de t.p. faible	
	65 %	35 %	
Nombre de t.p. dans les ovaires	Nombreux t.p. (>20)	Peu de t.p. dans les ovaires	
	42 %	58 %	
Répartition des t.p. dans les ovaires	Bonne répartition	Mauvaise répartition	
	48 %	52 %	
Pourcentage d'ovaires ayant des ovules fécondés		8,49 %	

¹: Callose produite par les tubes polliniques.

II-2 Viabilité des ovules.

La fluorescence après coloration au bleu d'aniline permet de caractériser la viabilité des ovules (Stösser et Anvari, 1983, Postweiler *et al.*, 1985). La fluorescence des ovules a donc été appréciée lors des observations d'ovules non pollinisés et prélevés sur des fleurs d'âges différents (Photo 11, annexe 11).

Nous constatons donc une disparité dans l'intensité de fluorescence selon les stades auxquels ont été prélevées les fleurs (Tableau X).

De manière générale le sac embryonnaire fluoresce plus que les tissus du nucelle. Les sacs embryonnaires des boutons semblent moins fluorescents que le témoin. Cependant dès que les boutons sont assez grands (environ 2 cm), ils semblent avoir des S.E. qui fluorescent de la même manière que des S.E. prélevées à des stades postérieurs. Les tissus du nucelle de tous les boutons fluorescent un peu moins que ceux des fleurs témoins.

De plus nous pouvons observer à partir de fleurs prélevées à des stades : anthèse, 24 h, 48 h et 72 h, une fluorescence des S.E. très variable. Les tissus du nucelle auront eux une fluorescence bien marquée et légèrement croissante avec des stades plus avancés. Nous avons remarqué de plus que pour le stade anthèse les tissus du nucelle avaient une fluorescence qui se rapprochait de celle des boutons dans 75 % des observations. La présence d'ovules provenant de fleurs âgées de 72 h ayant une fluorescence des tissus du nucelle très faible (environ équivalente à la fluorescence des nucelles de boutons) a été notée.

II-3 Généralités sur les croisements autogames (106 observations).

II-3-1 Caractéristiques de tous les croisements R x R effectués.

Il sera noté d'une part que la germination *in situ* du pollen est « propice » puisque dans 74 % des observations, le taux de germination semble être bien supérieur au taux observé lors des manipulations de germination *in vitro* (Tableau XI).

D'autre part des gynécées pollinisés présentant en majorité un grand nombre de grains de pollen sur le stigmate ont été observés (chaque croisement était effectué en saturant le stigmate de pollen). La germination apparaît être bonne et de nombreux tubes polliniques arriveront aux ovaires où ils se présenteront alors en agrégats dans certaines zones des ovaires. Nous avons remarqué de plus deux points à soulever :

- un arrêt net des tubes polliniques est observé dans 75 % des observations à l'approche des tissus des ovaires.
- le pourcentage de fécondation n'est pas nul (8,3 %), mais reste faible.

II-3-2 Problèmes posés par « l'Obturateur ».

Face au grand pourcentage de t.p. s'étant arrêtés au niveau de l'entrée dans les tissus de l'ovaire, nous avons donc effectué une étude complémentaire a été effectuée. Nous avons pollinisé un lot de fleurs (R x R) et laissé les fleurs 48 h en place. Nous avons observé ces gynécées et constaté que ces arrêts au niveau des tissus de l'ovaire persistaient.

De plus après une observation anatomique du gynécée de *Alpinia purpurata*, aucune barrière structurale ou physique empêchant l'accès aux ovaires n'a été constatée (Photo 12, annexe 12.).

Tableau XII.- Résultats des observations des croisements interspécifiques.

	Classes de fréquences		
	Nombreux (>50)	~20 à 50 grains	Pas de grains
Nombre de grains de pollen sur les stigmates	63,63 %	13,63 %	22,74 %
	56,25 %	37,5 %	6,25 %
	8,34 %	- ¹	91,66 %
Germination <i>in situ</i>	Bonne (>75%)	Intermédiaire (~50 %)	Mauvaise
	75%	8,34	16,66 %
	54,55 % ⁽²⁾	45,45 %	- ¹
	50 %	- ¹	50 %
Visibilité de la Callose des t.p.	Callose bien visible		Callose peu visible
	87,5 %		12,5 % ²
	63,64 %		36,36 % ²
	37,5 %		62,5 % ²
Comportement des tubes polliniques	Arrêt à l'arrivée des ovaires		
	23,81 %		
	31,25 %		
	20 %		
Comportement du faisceau de tubes polliniques dans le style	Baisse nette du diamètre du faisceau		Faible diminution du nombre de t.p.
	14,29 %		85,71
	25 %		75
	6,67 %		93,33 %
Nombre de t.p. dans les ovaires	Nombreux t.p. (>20)		Peu de t.p. dans les ovaires
	62,5 %		37,5 %
	50 %		50 %
	- ¹		100 %
Répartition des t.p. dans les ovaires	Bonne répartition		Mauvaise répartition
	50 %		50 %
	44,44 %		66,66 %
	25 %		75 %
Pourcentage d'ovaires ayant des ovules fécondés (selon nos observations)		14,29 18,75 % - ¹	

(¹): Résultats négligeables.

(²): Dans 23,93 % des cas, il y a une diminution de callose dans le style, callose qui réapparaît à la fin du style (cf. photo 13 et 14, annexe 12).

II-4 Croisements R x R, R x r, R x S.

Les résultats effectués sur 52 observations, sont présentés dans le tableau XII et indiquent que :

- ✓ Le croisement R x r assure une germination des grains de pollen remarquable, qui cependant n'égalera pas le croisement R x R. 25 % des observations (des gynécées) présentent une nette diminution du diamètre du faisceau de tubes polliniques le long du style (Photo 15 et 16, annexe 13). Cette diminution du nombre de t.p. le long du style sera complétée par l'arrêt des tubes polliniques au niveau de l'entrée des ovaires. Cependant les gynécées présentent un nombre considérable de t.p. dans les ovaires. Ce qui coïncidera avec un pourcentage élevé d'ovaires ayant au moins une fécondation (19 %).
- ✓ Le croisement R x S ne permet pas une bonne germination du pollen. De plus dans 20 % des observations, un nombre accru d'arrêt de tubes polliniques au niveau de l'entrée des ovaires est constaté (Photo 11, annexe 12). Le nombre d'ovaires, ayant au moins une fécondation probable, est alors très faible.
- ✓ Le croisement R x R assure la meilleure germination des grains de pollen. Mais 23 % des gynécées présente des arrêts nets de tubes polliniques au niveau de l'entrée des ovaires. Cependant les ovaires possèdent un grand nombre de t.p (Photo 17, annexe 13). Ce qui coïncidera avec un pourcentage élevé de fécondation (14 %).

Tableau XIII.- Résultats des observations des autopollinisations.

	Classes de fréquences		
	Nombreux (>50)	~20 à 50 grains	Pas de grains
Nombre de grains de pollen sur les stigmates	71,79 %	17,95 %	10,26 % ⁽³⁾
	55,55 %	44,45 %	-
	66,66 %	44,44 %	-
Germination <i>in situ</i>	Bonne germination (>75%)		Mauvaise germination
	88,3 %		11,7 %
	86,67 % ⁽¹⁾		13,33 %
Visibilité de la Callose	Callose bien visible		Callose peu visible
	76,48 %		23,52 %
	73,34 %		26,66 % ⁽²⁾
Comportement des tubes polliniques	Arrêt à l'arrivée des ovaires		
	28,21 %		
	6,66 %		
Comportement du faisceau de tubes polliniques dans le style	Baisse nette du diamètre du faisceau		Faible diminution du nombre de t.p.
	7,69 %		92,31 %
	x ⁴		x ⁴
Nombre de t.p. dans les ovaires	Nombreux t.p. (>20)		Peu de t.p. dans les ovaires
	15,38 %		84,62 %
	40 %		60 %
Répartition des t.p. dans les ovaires	Bonne répartition		Mauvaise répartition
	28,57 %		71,43 %
	40 %		60 %
Observation d'ovules en croissance et avec un tégument renforcé en callose			12,82 %
			30 %
			25 %

⁽¹⁾ : La germination pour R₁ x R₂ est « bonne » dans beaucoup de stigmate, cependant le croisement R₁ x R₁ présente de meilleurs taux de germinations sur les stigmates où ce pollen germe.

⁽²⁾ : Une diminution de visibilité de callose a été observée quand les t.p. sont en faible nombre.

⁽³⁾ : Sans doute dû aux conditions expérimentales, en effet nous observions tout de même, en général, un faisceau de t.p.

⁽⁴⁾ : Résultats non disponibles.

II-5 Croisement $R_1 \times R_1$, $R_1 \times R_2$, $R_1 \times R_3$.

Les résultats obtenus à partir de 52 observations et notés dans le tableau XIII, montrent que :

- ✓ Le croisement $R_1 \times R_1$ assure une germination des grains de pollen remarquable, qui cependant n'égalera pas le croisement $R_1 \times R_2$, mais le très grand nombre de gynécées ayant un nombre de grains de pollen supérieur à 50 sur le stigmate est étonnant. La diminution du nombre de t.p. le long du style se fera que pour 7,7 % des observations. Mais dans peu de cas (par rapport aux deux autres croisements) nous observons un nombre élevé de t.p. dans les ovaires : 15 %. Ce qui coïncidera avec le pourcentage d'ovaires fécondés de seulement : 13 %.
- ✓ Le croisement $R_1 \times R_2$ ne permet pas une bonne germination du pollen (55 % des styles ont un grand nombre de grains de pollen et 86 % des gynécées présentent une bonne germination). La totalité des gynécées ne semblent avoir qu'une faible diminution du nombre de t.p. le long du style. De plus seulement 6,7 % des observations présentent un grand nombre d'arrêt de tubes polliniques au niveau de l'entrée des ovaires. Enfin un pourcentage élevé d'ovaires ayant un grand nombre de t.p. est remarqué ; ce qui coïncidera avec le pourcentage d'ovaires présentant des ovules fécondés, qui est le plus élevé.
- ✓ Le croisement $R_1 \times R_3$ provoque une bonne germination du pollen dans presque 67 % des cas. Le très faible pourcentage d'observations présentant des t.p. arrêtés au niveau des ovaires est noté (6 % des cas) et induit par conséquent le grand pourcentage d'ovaires à grand nombre de t.p. La répartition des t.p. étant la plus homogène, un pourcentage de fécondation de 25 %, donc « important », était prévisible.

II-6 Croisement $R_{11} \times R_{12}$, $R_{21} \times R_{22}$, $R_{31} \times R_{32}$ (9 observations effectuées).

- ❖ $R_{11} \times R_{12}$: Le pollen est présent en grande quantité sur le stigmate de la fleur. Un faisceau de t.p. traduit la présence de nombreux tubes polliniques. Un grand nombre de t.p. est visible dans les ovaires mais leur répartition semble peu homogène au sein des ovaires. Cependant ce croisement se présente comme étant très « favorisé par les tissus femelles » de l'*Alpinia*.
- ❖ $R_{21} \times R_{22}$: Peu de tubes polliniques sont visibles dans le style. De plus nous observons un arrêt des tubes polliniques au niveau de l'entrée des ovaires.
- ❖ $R_{31} \times R_{32}$: Peu de Tubes polliniques sont visibles dans le style. Cependant quelques t.p. (5 à 6) arrivaient aux ovaires et étaient donc susceptible de féconder des ovules.

Ces deux derniers types de croisements sont donc les croisements qui semblent moins favorisés par les tissus du gynécée. Ces croisements pourraient donc avoir un certain niveau d'incompatibilité.

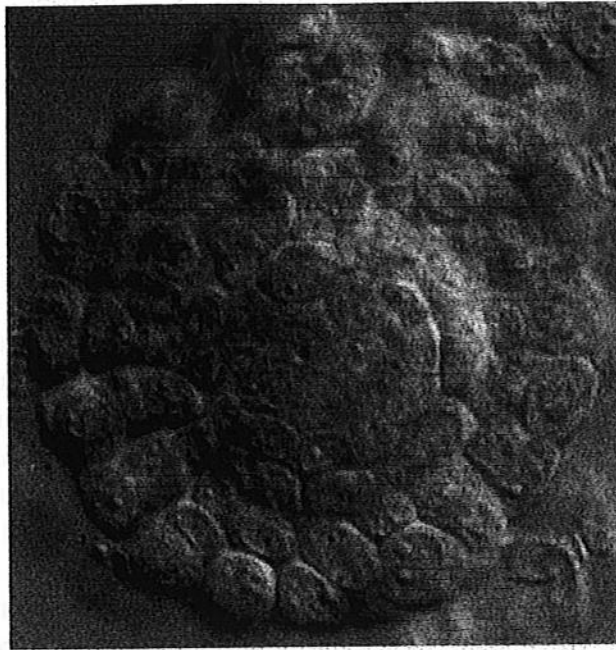


Photo 18.- Ovule observé en contraste interférentiel différentiel extrait d'ovaire au stade « B₁+B₂ » (x 40).

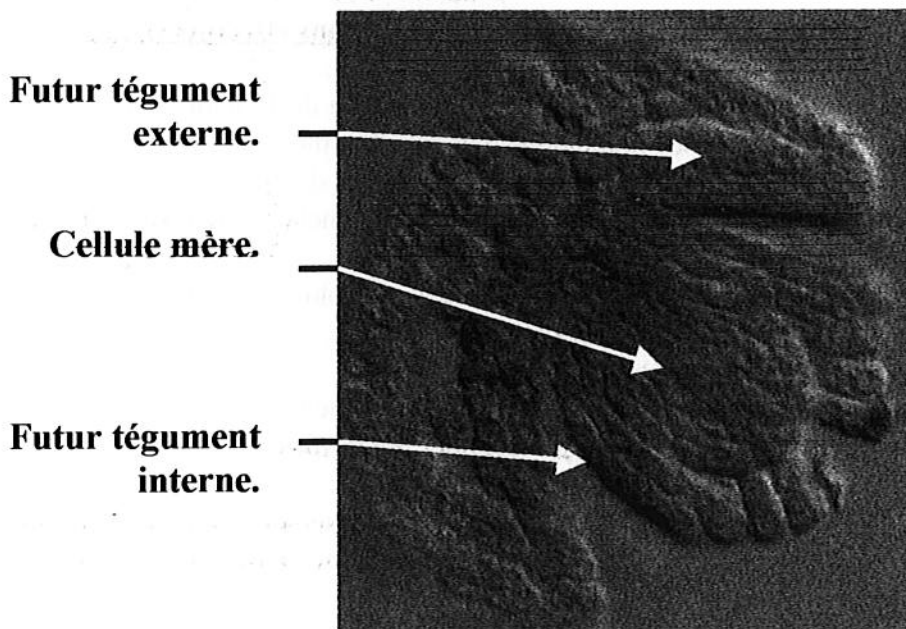


Photo 19.- Ovule extrait d'ovaire au stade « B₃ » (x 20).

III OBSERVATION DES SACS EMBRYONNAIRES GRACE AU CONTRASTE INTERFERENTIEL.

L'expérimentation se divise en deux parties :

-La première avait pour but de décrire la morphologie observée des ovules d'*Alpinia purpurata* et la mise en place du S.E. dans le temps.

-La seconde comportait différents croisements permettant de caractériser les phénomènes suivants :

Croisements effectués se composaient de :

R x R
R x r
R x S

On y ajoute des témoins ensachés non pollinisés et longistyles qui par conséquent ne seront pas pollinisés.

Ces types de pollinisations permettaient de comparer les différences entre les pollinisations intraspécifiques et interspécifiques.

Ces croisements sont faits et récoltés en séries de :

24^h, 48^h, 72^h, et 72+48^h après pollinisation.

L'évolution dans le temps des ovules et sacs embryonnaires pour les différents croisements pouvait alors être faite.

III-1 description morphologique des ovules d'*Alpinia purpurata*.

III-1-1 Développement dans les boutons.

L'observation d'ovules appartenant à des ovaires de tailles différentes, a permis de définir arbitrairement différents stades d'évolution des ovules au cours de leur maturation. Les stades définis ont été faits uniquement sur des différences de taille des ovaires lors du prélèvement.

❖ Stades B₁+B₂ :

Sur les boutons les plus petits, cinq couches cellulaires étaient observables à l'intérieur desquelles se situait la cellule mère. Cette cellule mère comporte un cytoplasme important (24,6 à 29,5 µm pour des ovules d'environ 86 µm), (Photo 18).

❖ Le stade B₃ :

Au stade suivant, les trois couches cellulaires les plus externes mesurant 34,4 µm d'épaisseur se fissure et se sépare du côté « pro-micropylaire », l'ovule alors observé mesure 135,3 µm de long. Le stade suivant se différenciera par la fissure et la séparation d'une seconde couche bicellulaire, l'ovule mesure alors 142,7 µm de diamètre. Deux téguments sont alors différenciés : le tégument interne, qui a une double couche cellulaire (sauf à sa base où il a trois couches cellulaires) avec des cellules plus ou moins cubiques ; et le tégument externe, qui est formé de plusieurs couches cellulaires (Photo 19).

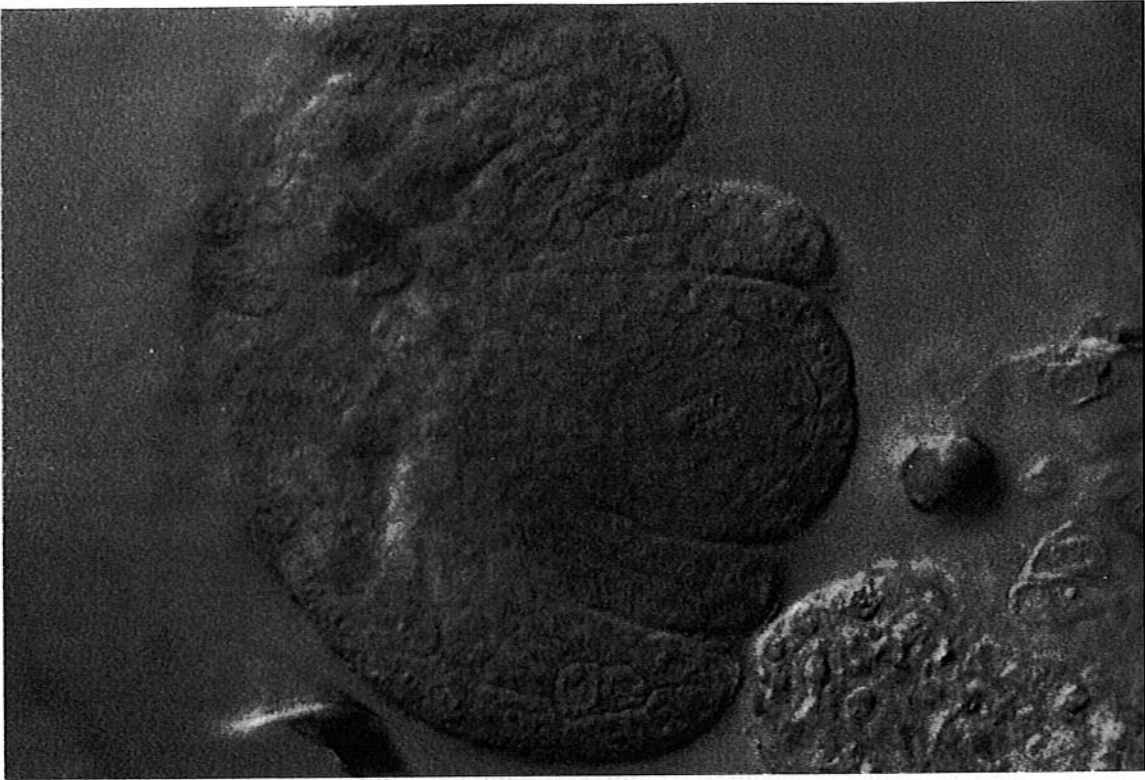


Photo 20.- Ovule extrait d'ovaire à un stade « B₃ » « plus avancé » (x 40).



Photo 21.- Cortex de l'ovule au stade 24 h (x 20).

L'observation de la division de la macrospore (de 19,7 μm de long) a pu être faite. Les deux cellules filles migrent vers la chalaze pour l'une et le micropyle pour l'autre. Le S.E. s'allonge dès lors et mesure : 49,2 à 56,6 μm (Photo 20).

A ce stade le « Cortex » composé de larges cellules réfringentes sur le tégument n'est toujours pas présent.

Ensuite la différenciation des premières cellules de la « coiffe » du côté de la chalaze s'opère. Les deux couches détachées se resserrent sur le S.E. La monocouche cellulaire connaît alors une phase de mise en place principalement par auxèse, pour une taille de l'ovule de 246 x 221,4 μm . Un « cache micropylaire » se met en place à partir des tissus du funicule, en dessous du micropyle.

❖ Le stade B₄ :

Le S.E. apparaît à ce stade avec une forme mature. Sa taille oscille entre 78,7 et 88,6 μm et la monocouche cellulaire est mise en place. Les cellules la composant mesurent alors 36,9 à 44,28 μm . Le S.E. possède cinq noyaux visibles : ceux des synergides, de l'oosphère et les noyaux polaires.

Le tégument interne possède des cellules à paroi renforcée à ses extrémités et mesure 11,07 μm d'épaisseur, le tégument externe mesure 72 μm d'épaisseur. L'ovule sans les téguments (le nucelle) mesure 145,14 μm . L'hypostase (cellules réfringentes au dessus du sac embryonnaire) est visible et dans certains cas la fusion de noyaux polaires semble effectuée.

Le cortex débute réellement son développement (il mesure 147,6 μm), la taille des ovules est alors de 319,8 x 319,8 à 369 x 300,1 μm .

❖ Le stade B₅ :

Les ovules mesurent en moyenne 393,6 x 356,7 μm . Le cache micropylaire est mis en place ; le cortex apparaît avec une longueur de 212,8 μm et le micropyle est mis en place. Le nucelle croît et mesure à ce stade 177,09 μm . Le S.E. fini son développement par une légère augmentation de longueur (103 μm).

❖ Le stade B₆ :

Les ovules mesurent environ 448,9 x 388,7 à ce stade. Nous observons un léger développement des téguments externe (108,24) et interne (12,3 μm). Le nucelle fini sa croissance à 209 μm et le cortex avoisine 227,5 μm (Photo 21). Le S.E., stabilisé à une longueur de 95 μm , et les cellules monocouches semblent ne pas se modifier. L'ovule semble alors anatomiquement apte à assurer sa fonction de réception des t.p. et de fécondation. Ils possèdent dès lors la taille adulte (les ovules observés ici se révèlent même plus gros que la moyenne des ovules pris à l'anthèse) et surtout le rapport : $\frac{\text{S.E.}}{\text{Taille de l'ovule}}$ est généralement compris entre 0,2 et 0,23 : coefficient moyen

observé pour les ovules matures.

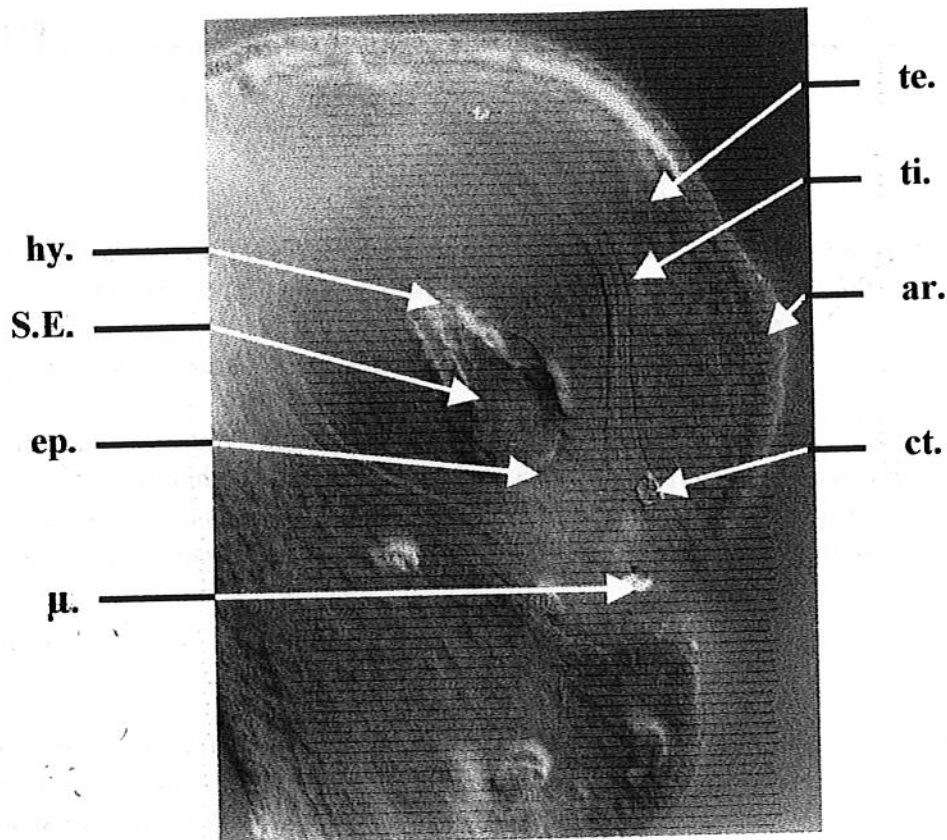


Photo 22.- Ovule mature (x 20).

ep. : épistase.
 ar. : aroncule.
 hy. : hypostase.

μ. : micropyle.
 ti. : tégument interne.
 ct. : cellules terminales
 réfringentes du tégument interne.

S.E. : Sac Embryonnaire.
 te. : tégument externe.

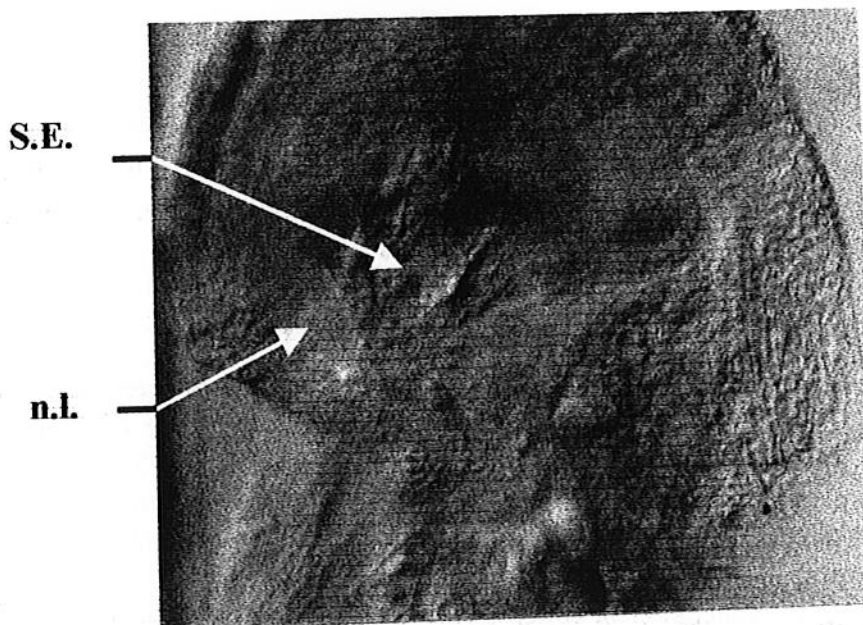


Photo 23.- Sénescence d'un ovule au stade 72 h (x 20).

S.E. : Sac Embryonnaire.

n.l. : nucelle lysé.

III-1-2 description de l'ovule mature réceptif.

En partant du Sac Embryonnaire (S.E.) pour s'éloigner vers la périphérie sont observés : un sac embryonnaire en forme de poire avec cinq noyaux des cellules de : l'oosphère, des deux synergides, et des deux noyaux polaires.

Une « épistase » (monocouche cellulaire) et une « hypostase » sont différenciables respectivement au-dessus du S.E. (soit du côté micropylaire) et au-dessous du S.E. (donc du côté de la chalaze). L'hypostase est constituée de cellules épaisses et réfringentes ; l'épistase consiste en une monocouche cellulaire allongée verticalement et dont les parois adjacentes sont lignifiées. L'épistase est constituée de 7 à 9 cellules. En observant à différentes profondeurs les tissus, environ quatre couches de ces cellules juxtaposées selon l'épaisseur de l'ovule sont visibles.

Cette épistase est ensuite relayée par deux épidermes. Le plus interne est constitué d'une couche bicellulaire dont les cellules extrêmes possèdent des parois particulièrement réfringentes. La couche épidermique la plus externe est pluricellulaire (7 à 9 couches de cellules) et différencie un amas cellulaire plus « charnu » du côté micropylaire qui constitue une « aroncule » dans le sens de Mangaly (1989) (l'autre se situant à l'opposé, c'est à dire sur le funicule, donc produit à partir du tégument et du funicule). La couche épidermique interne à l'aide d'une excroissance cellulaire, superposée à l'épistase et transpercée en son milieu assure la formation du micropyle et du col micropylaire. L'ovule est donc bien crassinucellé. Le micropyle débutera à partir de la couche monocellulaire jusqu'à un épaissement du funicule qui constitue un « cache micropylaire ».

Un « Cortex » est présent, il est formée de cellules réfringentes qui sont associées en stries au-dessus du tégument externe à partir de la chalaze jusqu'à la moitié de l'ovule.

Des tissus conducteurs sont particulièrement visibles à l'intérieur du funicule puisqu'ils sont en forme « d'échelle » très réfringentes. Le funicule est par ailleurs formé à sa base de cellules de forme cubique de très grande taille (24,6 μm) par rapport aux cellules présentes qui constituent le reste de l'ovule (Photo 22).

III-1-3 Sénescence des ovules non pollinisés.

Dès le stade 24 h le cortex devient « granuleux » sur sa moitié inférieure voir jusqu'à ses trois quarts. Ce phénomène sera d'autant plus marqué que le stade sera avancé. Cette apparence « granuleuse » semble causée par des vésicules à l'intérieur des cellules qui se videraient.

Les étapes suivantes montrent une désorganisation des tissus épidermiques. Les téguments externe et interne deviennent alors indifférenciables, ce qui est accentué par leur augmentation de réfringence. La lyse des cellules se produit aussi dans les tissus plus internes. L'ovule prend une forme triangulaire. Les stades les plus avancés présentent des résidus d'ovules qui retournent à une forme juvénile et non mature de l'ovule : forme arrondie décrite dans les stades B₁ et B₂. La photo 23 illustrera la description qui suit.

❖ Stade 48^h :

L'épiderme n'est pas encore totalement désorganisé, on peut encore deviner la limite des épidermes interne et externe.

L'épistase se rétrécit.

Le S.E. est difficile à observer par l'augmentation de réfringence, mais on peut constater qu'il conserve l'oosphère, les synergides mais sans les noyaux polaires. Le S.E. descend alors vers la chalaze. Le micropyle se désorganise totalement, ce qui entraînera la déformation de l'ovule.

Noyaux
polaires.

« Amas
basal. »

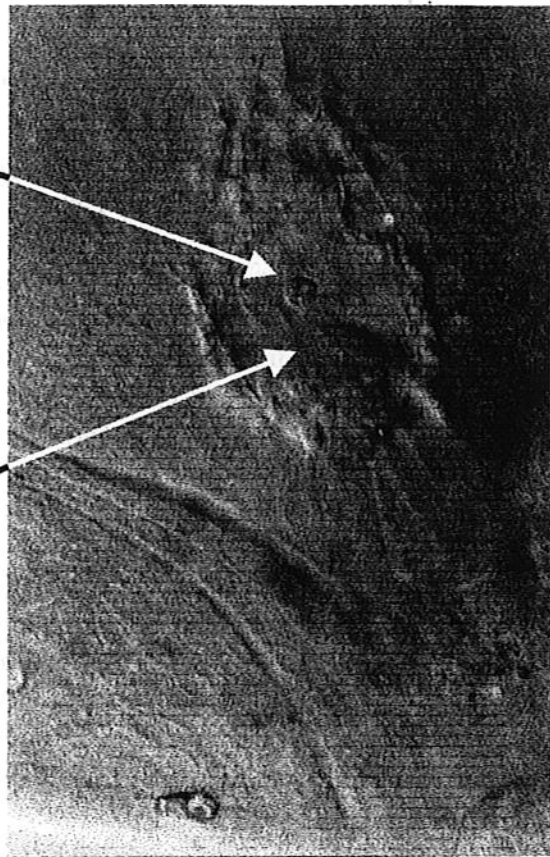


Photo 24.- Ovule au stade 48 h avec fusion des noyaux polaires et obscurcissement de l'amas basal, croisement R x R (x 40).

S.E.

t.p.

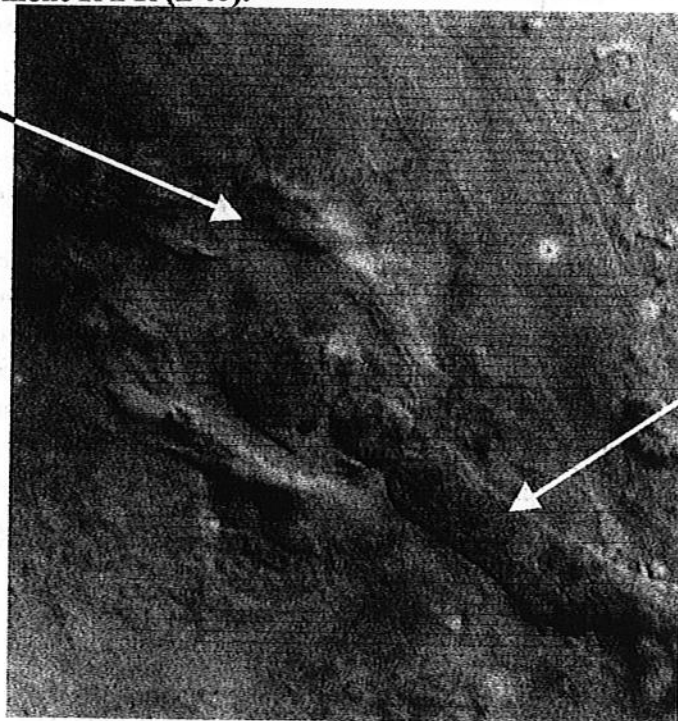


Photo 25.- Pénétration du tube pollinique dans le sac embryonnaire, croisement R x r, stade 72 h (x 40).

t.p. : tube pollinique.

S.E. : Sac Embryonnaire.

❖ Stade 72^h :

L'ovule à ce stade possède une forme demi-sphérique. Le cortex peut dans certains cas être granuleux sur toute sa longueur (il est alors totalement vidé).

Le S.E. présente plus qu'un « noyau » central, ce qui confirme le retour vers une morphologie d'apparence juvénile lors de la sénescence. Cependant certains S.E. présentait encore l'oosphère, les synergides et les noyaux polaires.

L'épistase disparaît, et le S.E. se liquéfie. L'hypostase est toujours présente, mais commence à disparaître. Le cortex est alors totalement vidé de son contenu.

L'observation d'un début de lyse du nucelle (début de désolidarisation du S.E.) est alors possible.

❖ Stade 72+48^h :

Le nucelle lysé permet la désolidarisation du S.E. Tout tissu est indifférenciable. Quand le contenu du S.E. est visible, seuls une « cellule » ou « noyau central » ou encore un amas basal très réfringent sont observés. Cependant le S.E. est toujours observable à ce stade par sa forme caractéristique de « poire » peu modifié malgré la sénescence.

III-1-4 Evolution des ovules après pollinisation.

Préparation à la « fécondation » :

Les noyaux polaires fusionnent à l'arrivée des t.p. Mais il semble aussi que ces noyaux fusionnent dès le stade anthèse (Photo 8, annexe 10), voir même le stade B₅. Cependant des noyaux polaires non fusionnés ont été remarqués pour un croisement R x r^{24 h}.

On peut avoir la formation d'un amas basal réfringent avant la fécondation de l'ovule (sans doute par stimulation de l'ovule lors de la pollinisation). Cet amas basal est situé vers la partie micropylaire du S.E. et masque donc l'oosphère et les synergides. Des ovules ont été vus avec ces amas basaux alors que le t.p. était au niveau du micropyle pour un croisement prélevé 24 h après pollinisation.

En présence d'ovules non pollinisés, les noyaux polaires fusionnés ne descendent pas mais s'il y a eu pollinisation, la descente des noyaux polaires vers la zone réfringente observée à l'emplacement des synergides et de l'oosphère vers le micropyle s'effectuera à l'approche des t.p. (Photo 24).

La fécondation (exemple de croisements R x R) :

La pénétration du t.p. dans le sac embryonnaire s'effectue par les synergides. Un « amas basal » est souvent visible, recouvrant les synergides et l'oosphère. Les noyaux polaires descendent vers l'amas basal (ils sont alors fusionnés).

Une synergide reste en place, alors que l'autre est lysée. Le cortex ne varie pas et les cellules constituant une couche monocellulaire s'écartent alors que le t.p. pénètre dans l'ovule en formant des coudes très réfringents dans le micropyle. Le t.p. s'épaissit dans le canal micropylaire, juste avant l'épistase (Photo 25).



Photo 23.- Sénescence d'un ovule au stade 72 h (x 20).

Après la fécondation :

Après la pénétration du tube pollinique dans la couche monocellulaire, l'épistase se divisent (Les cellules sont observées avec deux noyaux). Le S.E. devient flou empêchant alors l'observation des différentes divisions embryogènes. Au stade 72+48 h les premières divisions du zygote sont visibles. Il y a donc une phase de latence du zygote avant d'entrer en divisions, mais cette latence reste limitée (environ 100 h). Cependant, dans un cas, des œufs observés au stade 24 h était composées d'un zygote albumen de trois noyaux et le zygote comptait alors quatre noyaux.

La synergide reste encore visible au stade 24 h . L'amas basal peut ne pas être présent, ce qui permet une observation des cellules présentes et issues des divisions du zygote. Cependant ces phases visibles, où l'amas basal n'était pas présent, n'étaient pas assez nombreuses pour pouvoir effectuer une description fidèle de l'évolution du zygote.

Le retard de sénescence provoqué par une pollinisation (exemple de croisements R x r₇₂₊₄₈^h) :

Les ovules extraits de fleurs âgées de 72 + 48 h sont conservés dans leur forme et structure (cellules monocouches présentes, les deux téguments, qui composent l'ovule, restent distincts...), mais le début de sénescence se marque par un début de désorganisation des cellules. Les cellules présentent alors des noyaux déformés, des vacuoles nombreuses... Il y a désorganisation des tissus et le cortex apparaît granuleux.

A ces mêmes stades, les ovules non fécondés montrent une sénescence marquée : tissus totalement désorganisés, désolidarisation du S.E. des tissus du nucelle, l'ovule prend une forme de « **carphore** » (Photo 23).

Un début de division cellulaire du zygote est souvent visible pour les ovules fécondés. Au stade 48 h l'oosphère et les synergides restent présentes ce qui permet d'envisager que même si l'ovule n'a pas été fécondé, il a subi une stimulation causée par la pollinisation, qui a permis le maintien de l'ovule pendant un temps plus long.

Ce phénomène de retard de sénescence des ovules coïncide avec l'état des ovaires. En effet les ovules présentant de tels symptômes de pollinisation provenaient d'ovaires qui avaient un aspect charnu et se présentaient avec une taille supérieure malgré leur stade de prélèvement 72+48 h. Une accrescence des ovaires provoquée par l'excitation du gynécée par la pollinisation avait été effectuée. Les ovules avec une sénescence marquée provenaient d'ovaire à l'aspect desséché.

La fécondation apporte un retard certain à la sénescence des ovaires et ovules. Plus le nombre de fécondations est grand plus le retard de sénescence est marqué. Les ovules fécondés sont remarquables par rapport aux ovules non fécondés et il en est de même pour les ovaires. Nous avons donc une disparité de sénescence entre les ovaires, mais aussi entre ovules, et cette disparité est directement liée à la fécondation.

En effet des ovules issus d'un même ovaire de stade 72+48 h pouvaient être très bien préservés et même accrescent (cas d'un ovule fécondé). Au contraire les ovules pouvaient présenter des traits marqués de sénescence. Ainsi même si les ovules, issus de l'ovaire 72+48 h, étaient majoritairement fécondés, l'ovule non fécondé a dégénéré rapidement après un court temps de latence causé par la stimulation de la pollinisation.

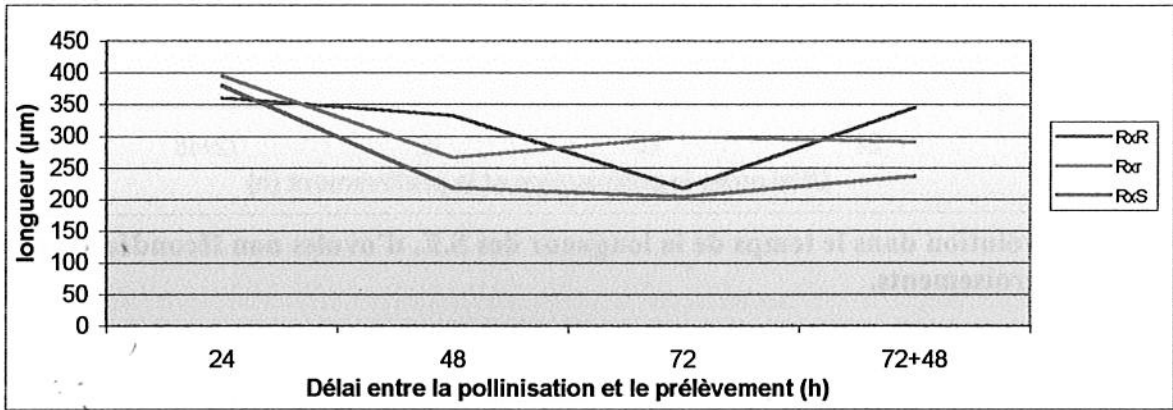


Fig. 26.- Evolution dans le temps de la longueur des ovules non fécondés ayant subi différents croisements.

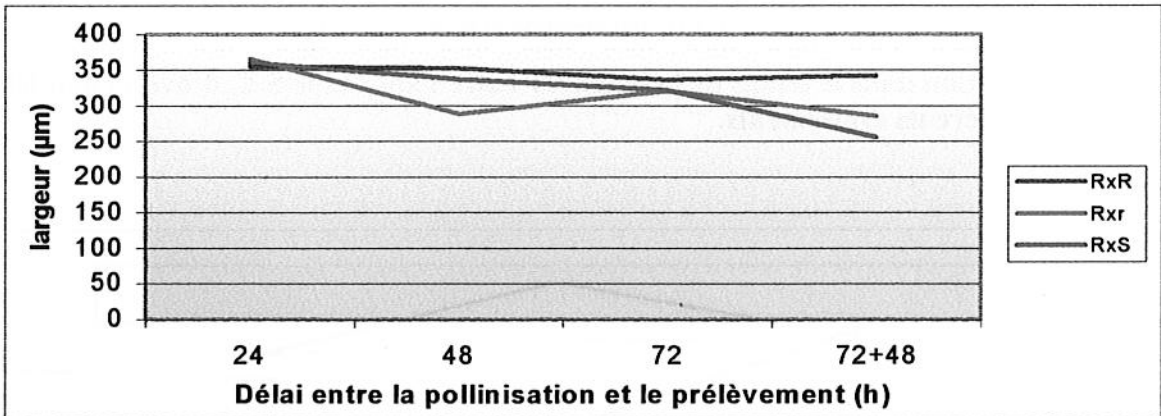


Fig. 27.- Evolution dans le temps de la largeur des ovules non fécondés ayant subi différents croisements.

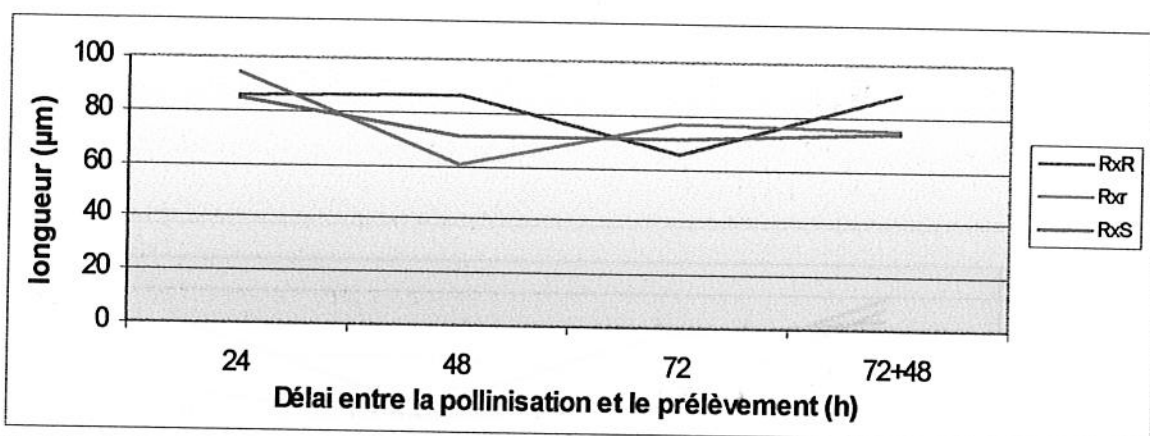


Fig. 28.- Evolution dans le temps de la longueur des S.E. d'ovules non fécondés ayant subi différents croisements.

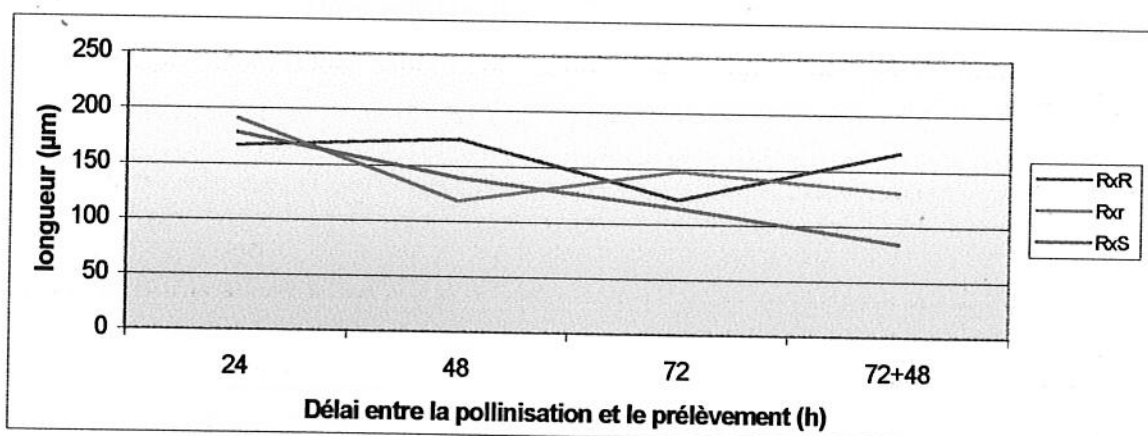


Fig. 29.- Evolution dans le temps de la longueur entre l'apex et le S.E. d'ovules non fécondés ayant subi différents croisements.

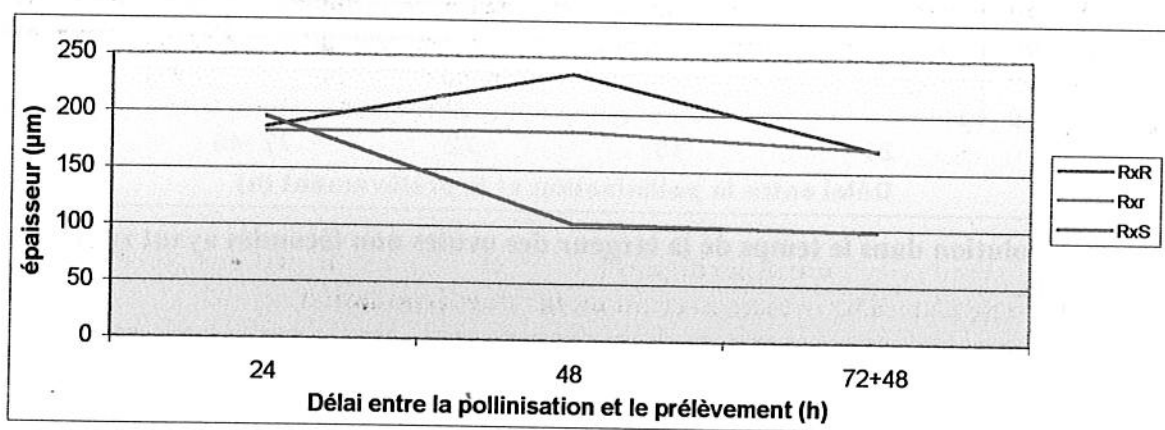


Fig. 30.- Evolution dans le temps de l'épaisseur du nucelle des ovules non fécondés ayant subi différents croisements.

Les différents stades chronologiques de la sénescence décrits ici se sont en plus distingués par une diminution générale dans le temps de :

- ❖ La longueur des ovules (Fig. 26.)
- ❖ La largeur des ovules (Fig. 27.)
- ❖ La distance entre l'apex (coté chalaze) et le S.E. (Fig. 29.)

Et une diminution plus légère de :

- ❖ La longueur des S.E. (Fig. 28.)
- ❖ L'épaisseur du nucelle, sauf dans le cas de croisement R x S (Fig.30.)

Le croisement R x R, se distingue des autres par des diminutions qui sont globalement inférieures aux autres croisements R x r ou R x S. Les ovules ayant subi un croisement R x R semblent donc rester plus « important » en taille plus longtemps.

III-2 Résultats des influences des différents croisements sur les ovules.

Tableau XIV.- Pourcentage d'ovaires contenant des t.p. et/ou des ovules fécondés.

	R x R	R x r	R x S
% d'ovaires fécondés	25 %	28 %	0
% d'ovaires ayant des t.p. non fécondants	25 %	14,2 %	28,5 %
% total d'ovaires présentant des t.p.	50 %	42,8 %	28,5 %

Le croisement R x S se démarque des deux autres croisements ; en effet aucun ovaire issu de ce croisement ne présente d'ovules fécondés, mais le pourcentage d'ovaires ayant des t.p. est de 28 %. 42 % à 50 % des ovaires ayant subis des croisements R x r ou R x R présenteront des t.p. De plus les croisements R x R et R x r présentent un pourcentage d'ovaires ayant au moins un ovule fécondé de 25 à 28 %.

**Si les croisements intraspécifiques (R x R et R x r) sont pris ensemble, ils présentent un pourcentage général d'ovaires avec au moins une fécondation de 30%.
Le pourcentage d'ovaires ayant des t.p. est alors de 40% sur ces même croisements.**

Tableau XV.- Pourcentages d'ovules fécondés ou de t.p. non fécondant dans les ovaires présentant des t.p.

	R x R	R x r	R x S
% d'ovules fécondés (t.p. fécondant)	25,8	25	-
	- ¹	-	-
	-	28,57	-
	40	-	-
% de t.p. non fécondant (observés)	6,66	6,25	10,53
	-	-	25
	-	-	-
	-	-	-

24^h-48^h-72^h-72+48^h

(1) : stades pour lesquels aucun t.p. n'a été observé dans les ovaires.

Les résultats, dans le tableau XV, souligne que les stades les plus avancés sont généralement dépourvus d'ovules fécondés et les ovaires ne présentent alors aucun t.p. Cependant les croisements R x r et R x R ont permis l'observation d'ovaires avec plus de 28 % voir 40 % d'ovules fécondés à des stades respectifs de 72 et 72 + 48^h.

Le croisement R x S ne présente aucun ovule ayant une possibilité d'être fécondé.

Les croisements R x R et R x r sont sensiblement identiques avec plus de 25 % d'ovules fécondés par ovaires et plus de 6 % de t.p. présents mais non fécondants.

Tableau XVI.- Pourcentage général des fécondations ou de simple présence de t.p. dans les ovaires « infectés ». (Les « moy des moyennes » sont calculées sans les observations R x S) :

	R x R	R x r	Moy des moyennes	R x S
% d'ovules fécondés (t.p. fécondant)	29,27	27,27	28,38	0
% de t.p. non fécondant (observés)	6,66	6,25	6,52	16,13
% total d'ovules ayant des t.p.	19,72	20,41	20	/

Le nombre moyen d'ovules fécondés atteint 28,38 %, que le croisement effectué soit R x R ou R x r. La différence entre les deux croisements est très faible, mais se sera le croisement R x R qui reste le croisement le plus fécond avec approximativement 29,27 % d'ovules fécondés dans l'ovaire. D'autres part le nombre de t.p. qui n'ont pas de rôle de fécondations est très faible, sauf dans le cas du croisement R x S ou plus de 16 % des t.p. ne sont pas fécondants et aucun ovule fécondé n'est observé.

La présence de t.p. dans les ovaires issus de croisements intraspécifique est relativement grande puisque environ 20 % des ovules ont un t.p. à proximité d'eux. Il sera noté que la majorité des t.p. présents autour des ovules ont un rôle de fécondation : seulement 6 % des ovules avec un t.p. à proximité ne sont pas fécondés !

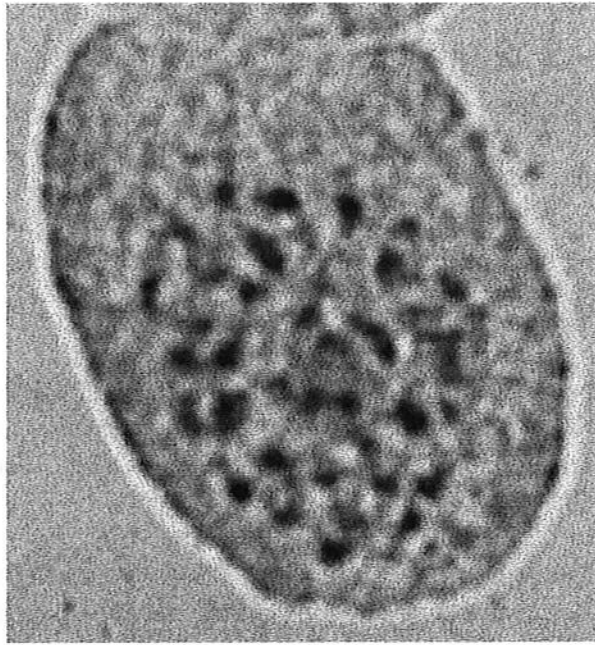


Photo 26.- « Comptage chromosomique » de l'*A. sandereae* (x 50).

IV COMPTAGE CHROMOSOMIQUE.

L'étude du nombre de chromosomes chez l'*Alpinia* se révèle être importante. D'une part, car la famille des *Zingiberaceae* possède une grande variabilité dans les nombres de base. Il est donc déterminant de connaître le nombre de chromosomes des deux variétés d'*A. purpurata* et de l'*A. sandereae* pour estimer si les croisements interspécifiques pourraient être viable.

D'autre part, même en connaissant les nombres de base des *Alpiniae*, on ne sait pas si ceux-ci peuvent avoir des degrés de ploïdie différents, ce qui est très fréquent chez de nombreuses espèces de *Zingiberaceae* (Ratnambal et Nair, 1982 a) (cf. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE II-5-4 Les chromosomes et l'incompatibilité.).

Ainsi l'étude de la reproduction des *A. purpurata* passera par un comptage chromosomique qui devrait permettre de déterminer la capacité de croisements inter et intraspécifique des *Alpinia*.

Les résultats obtenus présentent une grande variabilité. En effet l'observation des chromosomes s'est révélée difficile, car contrairement au piment, qui présente des chromosomes imposants pendant la division mitotique, les chromosomes d'*A. purpurata* se sont révélés petits (Photo 26).

Cependant à l'aide du nombre de base connu des *Alpiniae* (12) selon Ratnambal et Nair (1982 a), un test χ^2 a été effectué permettant de déterminer le nombre probable de chromosome des *Alpinia purpurata* rouge, rose et de l'*Alpinia sandereae*. Les résultats indiquent que :

- ✓ l'*Alpinia purpurata* rouge dénombrerait 24 chromosomes avec une probabilité χ^2 de 2,21E-05 % (probabilité la plus grande) sur 27 comptages.
- ✓ l'*Alpinia purpurata* rose compterait 36 chromosomes avec une probabilité χ^2 de 26,35 % sur 2 comptages.
- ✓ l'*Alpinia sandereae* aurait 24 chromosomes avec une probabilité χ^2 de 55,08 % sur 5 comptages.

DISCUSSION

I INTRODUCTION : MORPHOLOGIE DE L'ALPINIA PURPURATA.

La morphologie de l'*Alpinia purpurata* schématisée fig. 3, annexe 5 et d'après les travaux de Perricaud (1996), permet d'imaginer que cette plante est évolutivement en passe de devenir autogame (cf. **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE II-4-1** La pollinisation autogame et allogame.) comme l'ont fait beaucoup d'autres selon Raynal-Roques (1994). Sa petite fleur contractée ne permettrait le passage qu'à de très petits insectes qui seraient d'ailleurs très peu attirés par cette fleur blanche sans coloration distinctive, donc insipide à leurs yeux (Brahim *et al.*, 1990). Cependant, en observant la position des anthères dans la fleur et par rapport au style on constate que même s'ils sont relativement contractés, la position des anthères (entourant le style) semble être une bonne technique pour une pollinisation entomophile (ce qui pourrait par conséquent être un vestige évolutif de leur mode de pollinisation). Ainsi si la fleur d'*Alpinia* a un mode de pollinisation entomophile, le manque de fructification pourrait s'expliquer par l'absence de l'insecte pollinisateur en Guadeloupe ; puisque l'*Alpinia* est une plante non endogène (cf. **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE I-3-2-c** *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum.). Cependant si la raison de la non-fructification était seulement causée par l'absence de l'insecte pollinisateur, nous devrions observer un taux de nouaison important pour les pollinisations « artificielles » et un taux minimal avoisinant les 14,84 % à l'état naturel (en l'absence de tout autre phénomène d'incompatibilité). En effet le pourcentage de fleurs brévistyles est de 38,6 % (cf. Tableau IV), et plus de 38 % d'entre - elles ont un grand nombre de tubes polliniques dans les tissus du style. Ainsi si l'on considère cette plante en voie de devenir autogame, ce mode de pollinisation pourrait être celui qui aurait un taux de nouaison le plus grand, or c'est le cas : Le pourcentage du nombre de t.p. dans les ovules autofécondés est plus important que pour les croisements (cf. **RÉSULTATS II-1 Fleurs longistyles et brévistyles**). L'absence de fruit en conditions naturelles pour l'*Alpinia* est donc causée par un autre phénomène que la morphologie contractée des fleurs et l'absence de l'insecte pollinisateur, alors qu'en est-il du pollen et de son pouvoir de germination ?

II DISCUTONS LA VIABILITE, LA GERMINATION DU POLLEN ET LES TECHNIQUES D'OBSERVATIONS.

La viabilité et la germination du pollen est très variable (cf. **RÉSULTATS I RÉSULTATS DE LA PREMIÈRE ÉTUDE [TESTS D'ALEXANDER ET DE GERMINATION IN VITRO]**). Cependant ces variations semblaient significatives puisque les tests de germination et de viabilité avaient toujours des résultats concordants. Pour expliquer ce phénomène, ces variations ont été comparées à différents facteurs climatiques pour trouver une corrélation. Les résultats de cette analyse n'ont pas été présentés puisque aucune similitude entre les variations climatiques (présentées en annexe 14 et 15 fig. 31 à 35.) et les variations de germinations ou de viabilité du pollen n'ont pu être prouvées.

Malgré ces grandes variations, des taux de germination et de viabilité très grands ont été observés.

Les techniques d'Alexander et de germination *in vitro* ont donc permis d'établir des bases d'estimations de la qualité du pollen d'*Alpinia*. En effet les fig. 22 à 25 indiquent, que les deux techniques présentent des résultats qui évoluent sensiblement de la même manière dans le temps, ce qui prouve par ailleurs une certaine validité des résultats présentés. Cependant les grandes variations observées restent inexplicables et doivent être prises avec une certaine prudence.

D'autre part, les résultats de la germination *in situ* ont été plus rassurant pour la qualité du pollen (cf. **RÉSULTATS II-3-1** Caractéristiques de tous les croisements R x R effectués.).

Finalement, ce sont donc les résultats de la technique d'Alexander qui sont le plus proche de la réalité (malgré le manque de précision de cette technique vis à vis de techniques telles que le DAPI,... [Jahier *et al.*, 1992]) ; les résultats de germination auraient un décalage « négatif » avec la réalité, qui est probablement causé par le milieu de germination artificiel.

Une méthode de comptage serait envisageable avec l'association de l'épifluorescence et de coupes histologiques dans la paraffine (Bartz et Stöesser, 1989 ; Knox *et al.*, 1986 ; Kahm et De Masson, 1985). Elle permettrait alors une meilleure estimation du taux de germination.

Les « tea hybrid rose cultivars » étudiés par Voyiatzi (1995), ont un taux de germination de 18 % ; de même Mangaly et Nayar (1990), ont reporté des taux de viabilité des *Alpinia zerumbet* et *calcarata* respectivement de 53 et 35 % (cf. tableau VI, annexe 8). L'aubergine, plante taxonomiquement plus éloignée, atteint 80% de viabilité (Péto, communications personnelles). De même, le pollen de triticale a un taux de viabilité de 88 % (Sapra et Hughes, 1975). Or ces plantes sont aptes à se reproduire en conditions naturelles ; le triticale a un taux de nouaison de 70 % (Sapra et Hughes, 1975). Le pollen d'*Alpinia* est au moins aussi viable que le pollen de ces plantes, c'est pourquoi le pollen d'*A. purpurata* ne semble pas être la cause de l'absence de fruit en conditions naturelles en Guadeloupe. Le problème doit donc être plus « profond » dans la plante ; Les ovules seraient-ils la cause de ce problème ?

III OBSERVATION DE LA VIABILITE DES OVULES A L'AIDE DE LA FLUORESCENCE.

Contrairement aux résultats de Stöesser et Anvari (1983) ; Postweiler *et al.* (1985) sur cerisier, qui avaient des différences de fluorescence en fonction de la viabilité des ovules, cette technique s'est révélée peu efficace sur l'*Alpinia*. Même si il a été constaté une faible évolution de la fluorescence en fonction de l'âge des ovules, ces différences sont trop faibles pour être interprétables. De plus ces différences de fluorescence observées pour les ovules issus de boutons vis à vis des ovules issus de fleur recueillies à l'anthèse (ou après) semble être inféodé au fait que les tissus des ovaires de boutons ne sont pas définitivement mis en place et que par conséquent la croissance de l'ovule (et donc de ses tissus) provoque par effet de masse des tissus une augmentation de la fluorescence. Enfin les grandes contradictions observées sur les ovules font de cette technique une méthode de prévision de la viabilité des ovules peu sûre dans le cas de l'*Alpinia* (cf. **RÉSULTATS II-2 Viabilité des ovules.**). L'étude indirecte de la viabilité des ovules reposera donc sur la technique d'observation en contraste interférentiel différentiel.

IV ETUDE DE LA PROGRESSION DES TUBES POLLINIQUES SELON LES CROISEMENTS.

Lors des pollinisations chaque croisement était fait en double. Le premier était prélevé pour son étude au microscope, le second était un croisement témoin qui avait pour but d'observer le développement de fruit ou non. Aucun des croisements témoins restés sur le terrain n'a évolué, aucun fruit ne s'est développé malgré toutes les pollinisations effectuées. Cependant les ovaires utilisés comme témoin sur le terrain ont montré des symptômes d'**Alternarioses**. C'est pourquoi les avortements observés à l'issue de nos pollinisations peuvent être reliés à la maladie, ce qui a empêché des fructifications éventuelles.

IV-1 Croisements intraspécifiques $R_1 \times R_1$, $R_1 \times R_2$, $R_1 \times R_3$.

Si un classement des différents croisements était effectué à l'aide de leur capacité à pouvoir induire une fructification, le croisement $R_1 \times R_2$ est le croisement qui semble le plus « favorisé ».

En effet la bonne germination, le grand nombre de tubes polliniques dans les tissus et la bonne répartition des t.p. dans les ovaires ont amené le pourcentage d'ovaires fécondés à 30 %.

Le croisement $R_1 \times R_3$ pourrait être placé second, en effet suite à ce croisement nous observons en général de nombreux grains de pollen sur le stigmate, de nombreux tubes polliniques qui sont bien répartis dans les ovaires. En outre l'effet « obturateur » (arrêt des tubes polliniques à l'entrée de ceux-ci dans les tissus ovariens) est peu prononcé. Le croisement qui pourrait être classé comme dernier croisement ayant le plus de symptômes d'une pollinisation réussie (donc qui devrait se terminer par une fructification) est le croisement $R_1 \times R_1$. En effet moins de grains de pollen sont observés sur le stigmate, mais le taux de germination est plus grand. Cependant dans beaucoup de cas la diminution nette du faisceau de t.p. dans les tissus du style associé à un arrêt devant l'obturateur et une mauvaise répartition des t.p. dans les ovaires font des t.p. des éléments plus rares dans l'ovaire ayant subi un croisement $R_1 \times R_1$ qu'un ovaire ayant subi un croisement $R_1 \times R_2$.

Ces croisements qui sont en fait des autofécondations, permettent selon nos critères d'observations la fécondation d'un grand nombre d'ovules. Ce nombre de fécondations est supérieur au nombre de fécondations éventuelles des croisements interspécifiques. Ceci indiquerait donc que *Alpinia* favorise les pollinisations intraspécifiques et autogames (dans la mesure où même dans un croisement $R_1 \times R_3$, les gamètes mâles ont même génotype que les femelles), mais la position sur l'inflorescence de la fleur mâle par rapport à la fleur femelle semble influencer sur l'efficacité du croisement, comme c'est le cas chez *Brassica* (Chesnel, communications personnelles). En effet cette plante favorise surtout les croisements $R_1 \times R_2$. Le pollen qui assurera une pollinisation pouvant induire une fructification doit donc être pris sur la même inflorescence que la fleur femelle, mais sur une fleur différente.

Cas des croisements $R_{11} \times R_{11}$, $R_{21} \times R_{22}$, $R_{31} \times R_{32}$.

Ces croisements se rapprochent dans les résultats des croisements décrits ci-dessus. Cependant même si les résultats $R_{11} \times R_{11}$ sont proches des résultats obtenus pour $R_1 \times R_2$ ou $R_1 \times R_3$, les résultats obtenus avec les croisements $R_{21} \times R_{22}$ et $R_{31} \times R_{32}$ présentent beaucoup moins de pollen sur les stigmates et l'obturateur intervient alors dans plus de cas. Ces derniers croisements semblent un peu plus défavorisés que le croisement $R_{11} \times R_{11}$. Ce croisement $R_{11} \times R_{11}$ est en fait le même type de croisement que le croisement $R_1 \times R_2$ décrit ci-dessus, nous retrouvons donc des résultats très bons ce qui infirme le fait que ce croisement soit très favorisé. Les croisements $R_{21} \times R_{22}$, qui correspond au croisement $R_1 \times R_3$, et $R_{31} \times R_{32}$ sont des croisements plus « éloignés » qui présentent de moins bons résultats (cf. **RÉSULTATS II RÉSULTATS DE LA SECONDE ÉTUDE [OBSERVATIONS EFFECTUÉS SOUS FLUORESCENCE].**)

IV-2 Comparaison des croisements intra et interspécifiques $R \times r$, $R \times S$.

Le croisement $R \times r$ présente de nombreux grains de pollen et de t.p. respectivement sur les stigmates et les styles. La baisse du nombre de t.p. le long du style (dans 25 % des cas) et l'effet obturateur (dans 31 % des cas) est observé. Ceci induit la présence d'un nombre de t.p. observés dans les ovaires plus réduit que dans le cas de croisements intraspécifiques; mais n'empêche pas le grand nombre d'ovules éventuellement fécondés (dans 19 % des cas). Les t.p. auraient donc beaucoup de difficultés à arriver jusqu'aux ovules, mais quand le t.p. est arrivé au niveau des ovules, il sera facilement accepté pour accomplir la fécondation. Le système d'incompatibilité interviendrait donc, dans le cas de croisement $R \times r$, au niveau de l'« obturateur ».

Les croisements $R \times S$ se distinguent par de faible nombre de grains de pollen sur les stigmates, une mauvaise germination accentuée (dans 50 % des cas) et un faible nombre de t.p.

dans les tissus du style. Il y aurait donc en premier lieu problème de fixation du pollen sur le stigmate, Ce problème d'adhésion et d'hydratation correspondent aux problèmes décrits par Knox *et al.* (1986) ; Dumas et Gaude (1981) ; lors de pollinisation interspécifiques. **Le rejet du pollen est dans ce cas effectué par le style évitant alors les incongruïtés.**

Le nombre faible d'accrochage révèlent **qu'une incompatibilité de type gamétophytique s'ajoute pour éviter une incongruïté**, comme le décrivent Knox *et al.* (1986).

On remarque que dans 75 % des ovaires croisés R x S les bouchons de callose caractéristiques lors du développement des t.p. étaient très peu visibles. Contrairement aux croisements R x r et R x R, qui ont une incompatibilité moins marquée, présentent respectivement des t.p. avec des bouchons de callose généralement de plus en plus marqués. Un phénomène serait mis en évidence, il s'agit **d'une baisse de visibilité de callose lors de pollinisations incompatibles chez l'*Alpinia purpurata***. Ceci est donc le contraire du phénomène observé sur pétunia par Linskens et Esser (1957) ; puisqu'ils observaient une augmentation de la fluorescence de la callose lors de pollinisations incompatibles.

Les croisements intraspécifiques semblent donc les plus favorisés. Cependant le faible taux d'ovaires ayant des ovules fécondés montre que les problèmes suivants empêchent les fécondations :

- ✓ la baisse du nombre de t.p. dans les tissus du style, qui est observé dans 65 % des ovaires croisés R x R (Tableau XI).
- ✓ l'effet obturateur qui est présent dans 75 % des ovaires (Tableau XI).

Mais quel est cet effet obturateur ?

IV-3 L'obturateur.

Un effet « obturateur » a été observé dans nos résultats. Cet arrêt des tubes polliniques au niveau de l'entrée dans les tissus ovariens, a été très visible et dans de nombreux cas. Quel que soit le croisement on pouvait observer ce phénomène, mais il était plus fréquent pour certains croisements.

La photo 12, annexe 12, illustre bien ce phénomène. Le faisceau de t.p. s'arrête net comme s'il avait été cassé lors du Squash. Cependant ce symptôme de cassure des t.p. est un « artefact », en effet en regardant plus profondément dans les tissus ovariens, après cette cassure, les t.p. ne réapparaissent pas. S'il s'agissait d'une simple cassure ceux-ci seraient visibles un peu plus loin dans les tissus de l'ovaire. Ainsi les t.p. étaient réellement stoppés à cet endroit, seuls quelques-uns arrivaient à passer et leur nombre dépendait du croisement effectué.

Pour s'assurer que cet arrêt net des t.p. n'était pas la conséquence d'un prélèvement trop tôt des ovaires, ce qui aurait pour conséquence un développement des t.p. incomplet, une série de croisements, qui a été prélevée 48 h après la pollinisation (au lieu de 24 h), a été réalisée. En effet, selon Cerovic (1992), le développement des t.p. s'effectue en 4 à 6 jours chez le cerisier. Les t.p. avaient donc plus de temps pour se développer, mais l'observation a montré que l'effet « obturateur » était toujours aussi apparent et au même endroit. Or à 48 h les t.p. doivent être arrivés au niveau des ovules, sinon les ovules débutent leur dégénérescence (cf. **RÉSULTATS III-1-3** Sénescence des ovules non pollinisés.). Il ne s'agit donc pas d'un manque de temps des t.p. pour achever leur croissance, il s'agirait d'une barrière qui peut être due à :

- ✓ une incompatibilité gamétophytique : barrière de type chimique,
- ✓ ou de type structurale.

S'il s'agissait d'un obturateur de type physique comme c'est le cas pour les arbres fruitiers (Herrero, 1992), il devrait se liquéfier avant le stade 48 h pour que les t.p. aient le temps d'aller jusqu'aux ovules dans le cas d'une pollinisation compatible. Ce qui implique l'intervention là encore d'un système de reconnaissance des t.p. avant leur arrivée au niveau de l'« obturateur ». Au quel cas il y aurait là encore intervention d'un système d'incompatibilité gamétophytique !

Des coupes transversales au scalpel des gynécées ont alors été effectuées et observées à la loupe binoculaire. Un resserrement des tissus est visible à cet endroit, ce qui pourrait être l'objet d'une réduction du nombre de t.p. à cet endroit mais pas un arrêt qui est parfois quasi-total ! De plus ce resserrement des tissus au niveau de la fin du style est à confirmer à l'aide d'une technique plus adaptée tel que des coupes histologiques dans la résine.

La conclusion, qui serait la plus plausible selon les observations et en l'état actuel des connaissances, est que cet effet obturateur observé serait dû à un phénomène de type chimique ou électrochimique (Knox *et al.*, 1986). Ceci implique donc l'existence d'une **incompatibilité de type gamétophytique, qui se localise à l'entrée des ovaires dans les tissus du style, chez l'*Alpinia purpurata***, contrairement au *Crucifères*, *Caprifoliacées*, *Composées*... qui présentent une incompatibilité de type sporophytique (Raynal-Roques, 1994).

IV-4 Conclusion.

Les phénomènes observés à travers ces manipulations montrent que l'*Alpinia purpurata* rejette le pollen interspécifique par les systèmes d'adhésion, hydratation et une incompatibilité de type gamétophytique. L'autopollen et le pollen d'*A. purpurata* rose sont rejetés par incompatibilité gamétophytique localisée :

- ✓ dans le style, qui a pour effet une diminution du faisceau de tubes polliniques le long du style,
- ✓ à l'entrée dans les tissus ovariens, c'est l'effet obturateur.

Comme on l'a vu, les croisements en double (témoins) ne se sont développés, pendant des débuts de fructification ont été observés et l'on peut présumer que l'avortement de ces fruits était alors dû à l'Alternariose. Ceci indiquerait que nous avons alors eu tout de même des pollinisations « efficaces », qui entraînent la nouaison. Cependant ces pollinisations « efficaces » ont été très rares. Ainsi nous avons de la part du gynécée une incompatibilité gamétophytique située dans le style. Mais celle-ci ne semble pas suffisante pour expliquer le manque de nouaison (surtout dans le cas des croisements $R_1 \times R_2$ et $R_1 \times R_3$ qui ne subissent pas cette incompatibilité). Le manque de nouaison pourrait être dû à l'association d'un autre type de barrière, c'est pourquoi des investigations sur les ovules ont été faites à l'aide de la technique d'observation de Nomarski.

V DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS AVEC LES OBSERVATIONS EN CONTRASTE INTERFERENTIEL DIFFERENTIEL.

V-1 Morphologie et développement des ovules d'*Alpinia purpurata*.

Les différents stades arbitraires des ovaires optés pour l'observation du développement de l'ovule n'ont pas permis de mettre en évidence toutes les étapes de développement de l'ovule de l'*Alpinia*. La formation du S.E. n'est donc pas totalement détaillée et même si un stade Diade précédant le stade tétrade a été observé, le stade tétrade entre autre fait défaut. Néanmoins le développement permet d'affirmer que les primordia ovulaires du macrosporange sont « trizonés » dans le sens de Grootjen et Bouman (1981) ; ce qui délimite donc une troisième couche à divisions périclines et deux autres couches externes formées par divisions anticlines du placenta comme c'est le cas pour *Costus cuspidatus*.

De même les couches tégumentaires externes pluricellulaires et internes (bicellulaire) de l'ovule ne sont pas sans rappeler la structure des ovules de la majorité des monocotyledones, structures tégumentaires.

L'ovule mature d'*Alpinia* est anatrope et présente une épistase, une hypostase et deux aroncules, caractères communs chez les *Zingiberaceae* selon Mangaly (1989), Watson et Dallwitz (1992). Cependant l'*Alpinia* présente une aroncule relativement petite par rapport à certaines *Zingiberaceae*.

L'amas cellulaire superposé à l'épistase présente en son centre une « rainure » ayant pour but de laisser pénétrer les t.p. cependant l'épistase se présente comme une barrière physique à traverser pour le t.p. avant la libération des noyaux spermatiques dans le S.E.

Trois autres caractéristiques sont remarquables chez l'*Alpinia* :

1. l'absence d'antipodes comme l'ont décrit Watson et Dallwitz (1992) ; Ces noyaux étant éphémères. Cette caractéristique est aussi connue chez *Musa acuminata* selon Bouharmont (1963).
2. l'*Alpinia* est crassinucellé, contrairement à *Costus cuspidatus* (Grootjen et Bouman, 1981) et *Costus speciosus*, (Mangaly, 1989).
3. Le cortex de l'*Alpinia* n'est pas retrouvé chez d'autres *Zingiberaceae* tel que *Costus* ou *Curcuma* (Mangaly, 1989), mais il est retrouvé chez *Musa acuminata* (Bouharmont, 1963) ; Il est alors décrit comme disque de cellules sécrétrices au niveau de la chalaze.

Le développement du S.E. est comme pour le bananier, et les genres *Cichorum* ou *linum* un développement qui s'achève avant la pollinisation (Leveil *et al.*, 1985). En effet les noyaux polaires sont fusionnés probablement avant l'anthèse. La pollinisation n'a donc pas d'effet sur le développement du S.E., cependant l'effet de la pollinisation est remarquable sur la sénescence des ovules. Cet effet « anti sénescence » est retrouvé entre autre chez les arbres fruitiers (Herrero, 1992) et serait induit par la production de GA₃ qui activerait seulement le nucelle, le S.E. étant stimulé simplement par l'activité générale accrue. (Cependant pour Postweiler *et al* [1985] le GA₃ active la sénescence des ovules de cerisier).

Cette action « anti sénescence » de la pollinisation est cependant retrouvée que sur certains croisements que l'on pourra alors qualifier de « viable ».

L'action de la pollinisation sur la sénescence des ovules prouve l'existence d'un moyen de « communication » entre les t.p. et les ovaires, les ovules, comme l'ont décrit Fuller et Leopold

(1975) ; Dumas et Gaude (1981) ; Knox *et al* (1986)... Ce moyen de communication permet donc à l'*Alpinia* de reconnaître les différents pollens présents dans son gynécée et donc de favoriser ou non la fructification. Cependant ce retard n'empêchera pas la sénescence des ovules et des ovaires si le nombre d'ovules fécondés est trop bas (Bartz et Stöesser, 1989). D'autre part cette sénescence des ovules peut être un facteur limitant à la fécondation, comme le décrivent Bartz et Stöesser (1989). En effet les ovules pourraient être sénescents malgré une pollinisation si celle-ci présente un nombre de t.p. insuffisant ou si leur progression dans les tissus du style est trop lente. Cependant ceci ne semble pas expliquer pas la stérilité permanente de cette plante.

- ✓ En effet les ovules issus d'ovaires pollinisés restaient apparemment sans signe de sénescence plus de temps qu'il en fallait aux t.p. pour arriver aux ovules (24 h).
- ✓ Björkman (1995) a déclaré que le rapport des gamètes (mâles/femelle) pour *Fagopyrum* devait être de 10 pour qu'il y ait fécondations. Ce rapport restera à déterminer chez l'*Alpinia*, mais les fécondations d'ovules observées indiquent que le pollen est assez dense dans les ovaires (sinon il n'y aurait aucune fécondation). Donc tout les ovules sont susceptibles d'être fécondés.

« Alors que la durée de la phase progamique de la pollinisation à la fertilisation dure plusieurs heures, la phase finale de fertilisation ne dure que quelques minutes » (cité de Favre-Duchartre, 1970). C'est pourquoi il y a tant de difficultés pour observer la fécondation ! De plus chez l'*Alpinia* un obscurcissement de la base de S.E. a été observé ce qui rendait l'observation d'autant plus périlleuse. Cet obscurcissement est assez commun dans la littérature des *Zingiberaceae* et même des familles voisines (cf. photo 23). En effet Bouharmont (1963), a observé ce phénomène sur *Musa acuminata*.

Par la suite il y aura développement du zygote albumen puis de l'embryon après une phase de latence, comme l'ont décrit Bouharmont (1963) sur *Musa* ou Grootjen et Bouman (1981) sur *Costus*.

Finalement tous ces faits indiquent que les ovules d'*Alpinia* semblent se développer normalement par rapport aux ovules d'autres plantes systématiquement proches et fertiles. De plus lors des observations des développements de zygotes ont été décrits prouvant donc que l'*Alpinia* est une plante qui est fécondable. Cependant les fructifications manquent !

Seront alors soupçonnés :

- ✓ Le nombre trop faible de fécondations au sein des ovaires, ce qui induirait l'avortement des ovaires.
- ✓ Une incompatibilité postzygotique, qui favoriserait l'avortement des ovules fécondés.

V-2 Influences des différents croisements sur les ovules.

- ✓ La date de prélèvement influe sur les résultats (Tableau XV). La présence des t.p. s'est révélée plus rare dans les ovaires prélevés à des stades plus avancés. Ceci s'explique par la dégradation probable des t.p. dans les ovaires. Cependant les croisements R x R et R x r ont prouvé que la fécondation des ovules était plus visible dans les ovaires prélevés à des stades plus avancés. En effet la croissance du S.E. sur un ovule fécondé de 72^h par exemple permet la reconnaissance de tout ovule fécondé même si les t.p. sont absents. Ainsi les résultats de fécondations sont plus importants dans les stades plus âgés, puisque lors de l'extraction d'un ovule prélevé à un stade plus précoce, le t.p. peut être arraché, l'ovule peut alors être compté comme non fécondé alors qu'il l'était. Les résultats obtenus pour les stades précoces devront donc être pris avec beaucoup de précaution puisqu'ils minoreraient probablement la réalité.

- ✓ Sénescence du cortex
- ✓ Désorganisation des téguments puis du nucelle.
- ✓ Début de remontée du S.E. vers la chalaze.
- ✓ Disparition du micropyle.
- ✓ Changement de forme de l'ovule pour une forme triangulaire.
- ✓ Rétrécissement des cellules monocouches.
- ✓ Disparition totale du micropyle.
- ✓ Disparition totale des cellules monocouches.
- ✓ Disparition de l'hypostase.
- ✓ Les noyaux polaires sont dans la majorité des cas les derniers à disparaître (fusionnés ou pas).
- ✓ Désolidarisation de S.E. et liquéfaction de son contenu.

Fig. 36.-Rappel des grandes étapes chronologiques de la sénescence.

- ✓ Les croisements $R \times R$ et $R \times r$ se heurtent à une incompatibilité gamétophytique dans le style (cf. **DISCUSSION IV ÉTUDE DE LA PROGRESSION DES TUBES POLLINIQUES SELON LES CROISEMENTS**). Cependant les croisements intraspécifiques permettent l'observation de 30 ovaires fécondés sur 100. Les ovaires alors fécondés auront alors environ 29 % d'ovules fécondés (ce qui fait alors environ 52 ovules fécondés par ovaire). Peu d'ovaires semblent donc fécondés suite à un croisement ; mais si les ovaires présentent des t.p. il y aura alors de nombreuses fécondations : il y a peu de t.p. présents dans les ovaires qui ne féconderont pas les ovules (6,5 % selon les observations Tableau XVI). Ceci se répercute alors sur la sénescence des ovules est décrite Fig. 36. En effet la sénescence des ovules peut être caractérisée par l'évolution des cellules, des tissus ; mais aussi par les mesures de longueur, de largeur de l'ovule... On s'aperçoit alors que l'ovule qui a la sénescence la moins rapide (qui est alors caractérisée par une faible diminution de taille) est un ovule extrait d'ovaire ayant subi un croisement intraspécifique.
- ✓ Le croisement $R \times S$ se démarque là encore puisque le taux d'ovaires fécondés est nul, ceci malgré une présence de t.p. dans les ovaires. Ainsi l'incongruité est là encore évitée par une **incompatibilité de type gamétophytique au niveau des ovules**. Ceci se répercute encore une fois sur la sénescence des ovules, puisque les ovules issus de croisements $R \times S$ présentaient la sénescence visiblement la plus rapide (les différentes mesures diminuaient alors fortement : fig. 26, 29 et 30).

V-3 Conclusion.

Cette étude a donc révélé que l'*Alpinia* est une plante principalement autogame dont les appareils reproducteurs femelles semblent avoir un développement conforme à une utilisation opérationnelle pour la reproduction sexuée. De plus la période effective de pollinisation décrite par Stöesser et Anvari (1983) semble suffisante pour la fécondation chez l'*Alpinia*. D'autre part la densité de t.p. présent dans les ovaires est suffisante pour permettre des fécondations. C'est pourquoi des fécondations ont été observées, cependant un paradoxe s'installe quand on compare ceci avec les résultats de fructifications dans la nature : la nouaison de l'*Alpinia* même suite à des pollinisations intraspécifiques est très faible. Il y a deux explications possibles à ce phénomène :

✓ Alors que chez les *cucurbitaceae* une simple pollinisation peut provoquée la nouaison sans aucune fécondation (Fuller et Leopold, 1975), le taux de fécondations des ovules d'*Alpinia* doit être supérieur à 28 % (Tableau XVI) pour induire la nouaison. Ceci est probable puisque les quelques fruits qui ont été ramassés, dans une étude parallèle sur l'*Alpinia* non décrite ici, présentait un nombre de graines supérieur à 52 graines.

➤ Ce manque d'ovules fécondés pourrait provenir des incompatibilités gamétophytiques du styles et au niveau de l'entrée des ovaires, déjà décrites, qui ont pour but de limiter l'accès aux ovaires.

➤ Il pourrait y avoir l'intervention d'une incompatibilité de type gamétophytique située au niveau des ovules qui permettrait le rejet de nombreux t.p. au niveau du micropyle comme c'est le cas pour *prunus cerasus* selon Bartz et Stöesser (1989). Ce phénomène aurait dû être visible par un grand nombre de t.p. non fécondants présents dans les ovaires, cependant nos résultats indiquent le contraire. C'est pourquoi il faut critiquer la technique : en effet lors de l'extraction des ovules les t.p. sont arrachés et les t.p. non fécondants prélevés sont rares. De plus lors des observations à l'aide de la technique de Nomarski des apex de t.p. typiques d'une incompatibilité gamétophytique (t.p. spiralé, apex renforcé en callose) ont été observés. En outre lors des observations sous fluorescence beaucoup de t.p. ont été observés dans les ovaires pollinisés et le pourcentage de fécondation est faibles. C'est pourquoi une incompatibilité de type gamétophytique au niveau des ovules est probable, elle reste cependant à confirmer.

✓ Il pourrait y avoir présence d'une incompatibilité de type postzygotique (cf. **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE II-5-1** Quelques définitions et **II-5-4** Les chromosomes et l'incompatibilité) qui empêcherait la nouaison par avortement des embryons et donc des ovaires.

VI COMPTAGE CHROMOSOMIQUE.

Les résultats proposés dans le paragraphe **RÉSULTATS IV Comptage chromosomique**, doivent être pris avec beaucoup de précautions. La photo 26 traduit clairement la situation de l'expérimentateur. Des progrès doivent être fait dans l'étalement des cellules pour permettre une observation plus claire. Les chromosomes de l'*Alpinia* étant petit, cette technique devra être confortée à l'aide de technique de comptage plus précis. Il serait donc envisageable d'effectuer des comptages chromosomiques à partir de mitoses polliniques. Il serait en outre préférable de compléter ces observations par des mesures de cytométrie en flux à l'aide de plantes témoins tels que des *Alpiniae*, mais aussi des *Globba* ou *Hedichium* étudiées par Datta et Sarkar (1980).

CONCLUSION

Chacune des études présentées dans ce mémoire ont repoussé à chaque fois le problème de la stérilité des fleurs d'*Alpinia* de plus en plus loin. En effet l'étude de la fleur révèle que sa structure est digne d'une plante autogame, et que par conséquent d'éventuels pollinisateurs naturels ne font pas défaut. Le pollen s'est révélé être viable, en nombre assez grand pour permettre des fécondations et les ovules ont une structure et une espérance de vie suffisante pour permettre la fructification. Ceci a donc repoussé le problème au niveau de la physiologie même de la plante, de ses systèmes de rejets de pollens étrangers. Il a alors été découvert :

1. Une certaine inégalité de certains pollens par rapport à d'autres régnerait dans les tissus du style, le type d'incompatibilité mis alors en évidence est de type gamétophytique. Mais cette incompatibilité est-elle :
 - ✓ assez prononcée, quel que soit le type de pollen (auto ou allopollen), pour empêcher la fructification
 - ✓ ou est-elle aidée par d'autres phénomènes pour éviter toute fructification.
2. Le manque de nouaison peut être causé par une incompatibilité de type gamétophytique dont le lieu d'action serait modifié et se situerait au niveau des ovules (cf. **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE II-5-2-c Les ovules.**)
3. Les résultats obtenus par le comptage chromosomique n'ont pas été pris en compte lors de la discussion, la cause principale étant la faible visibilité des chromosomes de l'*Alpinia*. Les résultats obtenus sont donc peu fiables. De nouvelles manipulations s'imposent donc pour permettre de conclure sur les degrés de ploïdie des différents *A. purpurata* rouge et rose et l'*A. sandereae* (cytométrie en flux, comptage de mitose pollinique.). C'est ce degré de ploïdie de chacun d'entre-eux qui déterminera les perspectives de croisements entre ces trois *Alpinia*. Cependant cette étude ne pourra pas révéler la présence d'une incompatibilité chromosomique de type postzygotique par association de gènes létaux. Ainsi ce dernier type d'incompatibilité fera appel à de nouvelles études.

L'absence de fructification semblerait donc en fait être dû à une association d'incompatibilité :

- ✓ **gamétophytique au niveau du style et surtout de l'entrée dans les tissus ovariens,**
- ✓ **gamétophytique au niveau de l'entrée des ovules,**
- ✓ **et une incompatibilité postzygotique ne peut être écartée en l'état actuel des connaissances. Elle pourrait être due :**
 - **à la différence de ploïdie des *Alpinia***
 - **à l'association de gènes létaux.**

L'*Alpinia* en favorisant l'autopollen dans les tissus du style et l'allopollen dans les tissus ovariens apparaît comme contradictoire. Mais cette contradiction pourrait s'expliquer s'il s'avérait que l'*Alpinia* est une plante en voie de devenir autogame comme de nombreuses plantes l'on fait : le blé, la pomme de terre... Ainsi les barrières qui étaient présentes contre l'autogamie seraient encore actives et les barrières contre l'allopollen seraient mises en place, forçant l'*Alpinia* à devenir une plante à reproduction purement végétative.

D'autres expériences sont donc à mettre en place pour découvrir quelle est la barrière la plus contraignante et essayer de la contourner ; ce qui amènera peut-être l'expérimentateur à optimiser la fructification. Ceci permettrait d'entrevoir la mise en place d'un processus de sélection, par voie sexuée, de caractères économiquement intéressants. Le but final étant d'obtenir des variétés d'*Alpinia purpurata* commercialement intéressante du point de vue coloris, morphologie, longévité de la fleur, résistances aux parasites...

LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

- ANAÏS G., 1982.- Quelques réalités de l'agriculture guadeloupéenne. Bulletin Technique de l'Association des Ingénieurs et Techniciens Agricoles Guadeloupéens. 3 p.
- BAKER H. G., et BAKER I., 1983.- Some evolutionary and taxonomic implications of variation in the chemical reserves of pollen. *in* Pollen : Biology and implications for plant breeding. David L. Mulcahy and Ercole Ottaviano, ed. Elsevier Science Publishing Co. p. 43-52.
- BARTZ M. et STOESSER R., 1989.- Relation entre le nombre de tubes polliniques dans le style des cerises acides (*Prunus cerasus*) et la nouaison. *Gartenbauwissenschaft*. 54 (3) : 132-137.
- BJÖRKMAN T., 1995.- The effect of pollen grain competition on fertilisation success and progeny performance in *Fagopyrum esculentum*. *Euphytica*. 83 : 47-52.
- BOUHARMONT J., 1963.- Evolution de l'ovule fécondé chez *Musa acuminata colla subsp. Burmannica simmonds*. *in* La cellule, Louvain, Belgique. 13 (2) : 262-279.
- BRAHIM B.N., BOUSSAÏD M. et MARRAKCHI M., 1990.-Analyse de la biologie florale chez trois espèces annuelles de *Lathyrus*. *Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie*. 63 (15) : 21.
- BURTT B.L. et SMITH R.M., 1990.- Zingiberaceae. *in* Dassanyake, M.D. ed. Revised Handbook of the Flora of Ceylon. p. 488-532.
- CAMERON J.W. et SOOST R.K., 1969.- Characters of new populations of *Citrus* polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny. *in* Proceedings First International Citrus Symposium. 1 : 199-205.
- CARPUTO D., CARDI T., FRUSCIANTE L. et PELOQUIN S.J., 1995.-Male fertility and cytology of triploid hybrids between tetraploid *Solanum commersonii* ($2n = 4x = 48$, 2EBN) and *Phujera-Tuberosum* haploid hybrids ($2n = 2x = 24$, 2EBN). *Euphytica*. 83 : 123-129.
- CEROVIC R., 1992.- Pollen tube growth in sour cherry pistils in relation to fruit set. *Adv. Hort. Sci.* 6 : 107-111.
- COUSIN M., 1995.- Tubes Polliniques et Appareil reproducteur chez l'Amandier, Variété Auto-compatible Lauranna (*Amygdalus communis* L.) : Techniques d'observations. Mémoire de Licence de Phytoprotection, Université d'Avignon. 20 p.
- DAFNI A., 1992.- Pollination Ecology – A Practical Approach. *in* The Practical Approach Series. Series editors : Rickwood D. and Hames D. Oxford University Press, New York. 250 p.

- DATTA N. et SARKAR A.K., 1980.- Cytology of *Mantisia* – A genus under the family Zingiberaceae. Cell and Chromosome Newsletter. 3 (2) : 39-40.
- DICK H., 1992.- Australian plant gardening in the tropics and rain forest gardens. Australian Plants. 16 (130) : 239-243.
- DUMAS C. et GAUDE T., 1981.- Stigma-pollen recognition and pollen hydration. Phytomorphology. 31 : 191-201.
- DUMAS de VAULX R., 1992.- Germination du pollen *in situ*. in Techniques de cytogénétique végétale. Jahier J., INRA ed., Paris. p.110.
- FAVRE-DUCHARTRE M., 1970.- Des ovules aux graines. Masson et C^{ie}. ed. Paris. 136 p.
- FOURNET J., CAREDDA B., GUILLOT C., LORUT J. et DURAND Y., 1990.- La grande encyclopédie de la caraïbe, Flore 1. Sanoli ed. Italie. 213 p.
- FULLER G.L. et LEOPOLD A.C., 1975.- Pollination and the timing of Fruit-set in cucumbers. Hortscience. 10 (6) : 617-619.
- GROOTJEN C.J. et BOUMAN F., 1981.- Development of the ovule and seed in *Costus cuspidatus* (N.E.Br.) Maas (Zingiberaceae) with the reference to the formation of the operculum. Botanical Journal of the Linnean Society. 83 : 27-39.
- HARLAN J.R. et DEWET J.M.J., 1975.- On Ö. Winge and A. Prayer : The Origins of Polyploidy. The Botanical Review. 41 (4) : 361-390.
- HEPHER A. et BOULTER M.E., 1987.- Pollen tube Growth and Fertilisation Efficiency in *Salpiglossis simuata* : Implication for the Involvement of chemotopic Factors. Annals of Botany. 60 : 595-601.
- HERRERO M., et DICKINSON H.G., 1980.- Pollen Tube Growth Following Compatible and Incompatible Intraspecific Pollination in *Petunia hybrida*. Planta. 148 : 217-221.
- HERRERO M., 1992.- From pollination to fertilization in fruit trees. Plant Growth Regulation. 11 : 27-32.
- ISHIZAKA H. et UEMATSU J., 1995.- Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpuracens* Mill. produced by ovule culture. Euphytica. 82 : 31-37.
- JAHIER J., CHEVRE A.M., EBER F., DELOURME R. et TANGUY A.M., 1992.- Techniques de cytogénétique végétale. Jahier J., INRA ed., Paris. 183 p.

JOVANKA A., DOZET B. et SKORIC D., 1995.- Meiosis and pollen grain viability in *Helianthus mollis*, *Helianthus salifolius*, *Helianthus maximiliani* and their F₁ hybrids with cultivated sunflower. *Euphytica*. 81 : 259-263.

KAHM T.L. et DE MASSON D.A., 1986.- A quantitative and structural comparison of Citrus pollen tube development in cross compatible and self incompatible gynoecia. *Can. J. Bot.* 64 : 2548-2555.

KHURANA A. et HO C.T., 1988.- High performance liquid chromatographic analysis of curcuminoids and their photo-oxydative decomposition compounds in *Curcuma longa* L. *Journal of Liquid Chromatography*. 11 (11) : 2295-2304.

→ KNOX R.B., WILLIAMS E.G. et DUMAS C., 1986.- Pollen, pistil, and reproductive function in crop plants. *Plant Breeding Reviews*. 4 : 9-79.

KRESS W.J., 1990.- The phylogeny and classification of the Zingiberales. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 77 : 698-721.

LECUYER M.P., ZHANG Y.X., TELLIER M. et LESPINASSE Y., 1991.- *In vitro* pollen tube division of irradiated and non irradiated apple pollen. *Agronomie*. 11 : 483-489.

LEVEIL C., HUYGHE C. et CAUDERON A., 1985.- Observation des gamétogenèses mâle et femelle, de la fécondation, et de la formation d'embryons non zygotiques, après éclaircissage des anthères et sacs embryonnaires de *Cichorium intibus* L. et de *Linum usitatissimum* L. *C.R. Acad. Sc. Paris. série III*, 301 (7) : 373-378.

LINSKENS H.F. et ESSER K.I., 1957.- Über ein spezifische Anfängerung der pollenschläuche im Griffel und die Zahl der Kallosepfropfen nach Selbstung und Fremdung. *Naturwiss.* 44 : 16.

LLUGANY M., MASSOT N., WISSEMEIER A.H., POSCHENRIEDER C., HORST W.J. et BARCELO J., 1994.- Aluminium Tolerance of Maize Cultivars as Assessed by Callose Production and Root Elongation. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 157 : 447-451.

MAIZONNIER D., 1992.- Fertilité pollinique après coloration (ALEXANDER). *in* : *Techniques de cytogénétique végétale*. Jahier J., INRA ed., Paris. p.101.

MANGALY J.K., 1989.- Morphology of the ovule and ovular appendages in south indian Zingiberaceae. *Acta Botanica Indica*. 17 : 82-87.

MANGALY J.K. et NAYAR J., 1990.- Palynogy of South Indian Zingiberaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 103 : 351-366.

MARTIN F.W., 1958.- Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*. 34 : 125-128.

OARD J. H. et HU J., 1995.- Inheritance and characterization of pollen fertility in photoperiodically sensitive rice mutants. *Euphytica*. 82 : 17-23.

PERRICAUD A., 1996.- La biologie florale de l'*Alpinia purpurata* et l'étude du gamète mâle. Mémoire BTS Anabiotech, Université de Melle. 30 p.

PIMIANTA E. et POLITO V.S., 1983.- Embryo sac development in Almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb] as Affected by cross-, self- and Non pollination. *Ann. Bot.* 51 : 469-479.

POSTWEILER K., STÖSSER R. et ANVARI S.F., 1985.- The effect of different temperatures on the viability of ovules in cherries. *Scientia Hortic.* 25 : 235-239.

RATMANBAL M.J. et NAIR M.K., 1982 a.- Microsporogenesis in Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Proceeding of the fourth Annual Symposium on plantation crops (placrosym IV). Vishveshvara ed., Mysore. p. 42-57.

RATMANBAL M.J. et NAIR M.K., 1982 b.- Colchicine Induced Tetraploids in Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Journal of plantation crops*. 10 (1) : 57-61.

RAYNAL M., ASPART L., GAUBIER P., GRELLET F. et DELSENY M., 1992.- Gene Expression During Formation and Maturation in *Crucifereae*. Reproductive Biology and Plant Breeding. Datté Y., Dumas C. et Gallais A. eds. XIIIth Eucarpia Congress, Angers, France. Springer - Verlag, Berlin. 455 p.

RAYNAL-ROQUES A., 1994.- La botanique redécouverte. INRA. Belin, Paris. 511 p.

ROUILLARD G. et GUEHO J., 1983.- Histoire des plantes d'intérêt horticole, médicinal et économique à l'Ile Maurice. *Revue Agricole et Sucrière de l'Ile Maurice*. 62 (3) : 149-165.

SABU M. et MANGALY J.K., 1991.- *Alpinia smithiae* (Zingiberaceae) : a new species from south india. *EDINB. J. BOT.* 48 (1) : 69-71.

SAPRA V.T. et HUGHES J.L., 1975.- Pollen production in hexaploid triticale. *Euphytica*. 24 : 237-243.

SCHMELZER G.H. et RENNO J.F., 1997.- Genetic variation in the agamic species complex of *Pennisetum* section *Brevivalvula* (*Poaceae*) from West Africa : ploidy leves and isozyme polymorphism. *Euphytica*. 96 : 23-29.

- SCHULTZ-SCHAEFFER J., 1985.- Cytogenetics - Plants - Animals - Humans. Springer-Verlag, New York. 446 p.
- SCOTT R., HODGE R., PAUL W. et DROPER J., 1991. - The molecular biology of anther differentiation. *Plant Science*. 80 : 167-191.
- SESHAVATHARAM V. et SUBBA RAO K.V., 1982.- Megasporogenesis in some *dalbergiæ*. *Current Science*. 51 (6) : 295.
- SINGSIT C., HOLBROOK C.C., CULBREATH A.K. et OZIAS-AKINS P., 1995.- Progenies of an interspecific hybrid between *Arachis hypogaea* and *A. stenosperma* - pest resistance and molecular homogeneity. *Euphytica*. 83 : 9-14.
- SMITH R.M., 1980.- Three new species of zingiberaceae from Australia. *Notes R.B.G. Edinb.* 38 (3) : 517-525.
- SMITH R.M., 1990.- *Alpinia* (Zingiberaceae) : a proposed new infrageneric classification. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburg. J. Bot.* 47 (1) : 1-75.
- SMITH R.M., 1991.- *Pleuranthodium* replaces the illegitimate *Psychanthus* (Zingiberaceae). *Edinb. J. Bot.* 48 (1) : 63-68.
- SMITH R.M., 1992.- Australian Zingiberaceae. The ginger family. *Australian Plants*. 16 (130) : 245-253.
- STARRANTINO A. et REFORGIATO RECUPERO G., 1981.- *Citrus* hybrids obtained *in vitro* from 2x females X 4x males. *Proc. Int. Soc. Citriculture*. 1 : 31-32.
- STEBBINS G.L., 1971.- Chromosomal Evolution in Higher Plants. Barrington E.J.W. et Willis A.J. eds. Addison-Wesley Publishing Company, Great Britain. 216 p.
- STEFFEY J., 1986.- The ginger family. *American Horticulturist*. 64 (4) : 6-9.
- STÖESSER R. et ANVARI S.F., 1983.- Pollen growth and fruit set as influenced by senescence of stigma, style and ovules. *Acta Horticulturae*. p.13-22.
- THEOBALD L. et LUCAS S.A., 1982.- The garden's zingiberaceae collection : gingers and their relatives. *Pacific Tropical Botanical Garden*. 12 (2) : 29-31.
- TUPY J., 1961.- Changes in Glucose and Fructose Level in *Nicotiana alata* Styles and Ovaries Accompanying Compatible and Incompatible Pollen Tube Growth. *Biologia Plantarum*. 3 (1) : 1-14.

VENNAT F., CAZENAVE J., TUDEAU L., ROSAMBERT L. et RENIA C., 1995. Tableaux Economiques Régionaux. Guadeloupe. INSEE. Pointe à Pitre. p.86-97. 135 p.

VOYIATZI C.I., 1995.- An assessment of the *in vitro* germination capacity of pollen grains of five tea hybrid rose cultivars. *Euphytica*. 83 : 199-204.

WASTIAUX G., 1994.- La microscopie optique moderne. *in* Technique & Documentation – Lavoisier ed., Paris. 261 p.

WATSON L., et DALLWITZ, M. J., 1992 (onwards).- The Families of Flowering Plants : Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. Version: 16th March 1997. URL <http://www.keil.ukans.edu/delta/>.

VAN WENT J.L., 1992.- Fertilisation in Angiosperm Plants. *in* Reproductive Biology and Plant Breeding. Datté Y., Dumas C. et Gallais A. eds. XIIIth Eucarpia Congress, Angers, France. Springer - Verlag, Berlin. 455 p.