

## CONSERVATION DU POLLEN DE CACTUS PAR CONGELATION

En 1955, dans le cadre de son travail de thèse à Wageningen, Tijs Visser s'intéresse au stockage et à la germination in vitro du pollen des poiriers et des pommiers. À cette occasion, il constate que le pollen germe mieux lorsque la teneur en eau a été abaissée et lorsqu'il a été conservé à très basse température. La viabilité n'est pas affectée après deux ans de stockage à moins 180°C.

C'est donc sur la teneur en eau et les différentes méthodes de conservation que vont se focaliser les recherches pendant deux à trois décennies. Il fallait non seulement que la viabilité du pollen soit conservée, mais aussi que l'intégrité des glycoprotéines de l'enveloppe externe soit maintenue afin que la reconnaissance par le stigmate permette la germination du pollen (Charrier 1990). Ces recherches ont d'abord été conduites sur les plantes ligneuses fruitières et forestières, puis sur les céréales.

Malgré les différences d'aptitude à la conservation selon les espèces, un consensus s'est dégagé sur l'abaissement de la teneur en eau au seuil de 5% à 2% par dessiccation sous vide à température ambiante et conservation à température négative. C'est sur la base d'une lyophilisation rapide et d'une conservation par congélation que s'est constituée la banque des pollens du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris à partir de 1983 (Cerceau-Larrival, 1995). Parmi les 250 espèces embarquées figurait une cactée : *Harrisia nashii*. Peut-être y est-elle encore ?

En 1998 (a, b) et 2000, Julia Buitink explique le maintien de la viabilité des pollens par les mécanismes physiques et moléculaires de la vitrification du milieu intra-cellulaire (détaillée in Derouet 2010, page 18). Elle met en évidence les interactions entre la température de stockage, la teneur en eau et leur influence sur le vieillissement du pollen.

C'est en avril 2000 qu'une équipe israélienne (Metz, Nerd et Mizrahi) publie une technique de déshydratation du pollen afin de le conserver plusieurs mois par congélation pour réaliser la fécondation croisée de deux cactus (*Hylocereus undatus* et *H. polyrhizus*). Ces plants clonés destinés à produire des fruits pour la consommation sont autostériles et ont des pics de floraison décalés dans la saison.

La technique élaborée et les moyens adoptés semblent suffisamment simples pour être mis en œuvre par l'amateur de cactus.

### LA TECHNIQUE "DES HYLOCEREUS"

Les pollens de *Hylocereus undatus* et *H. polyrhizus* présentent une teneur en eau de 18% à 22% lorsqu'ils sont récoltés le matin et 45% à 50% le soir. On sait que les pollens riches en eau ne sont pas viables longtemps. Quelques heures au plus. Il faut donc les déshydrater.



Fruit de *Hylocereus undatus*  
Photo by Maja Dumat - flickr.com

## La déshydratation

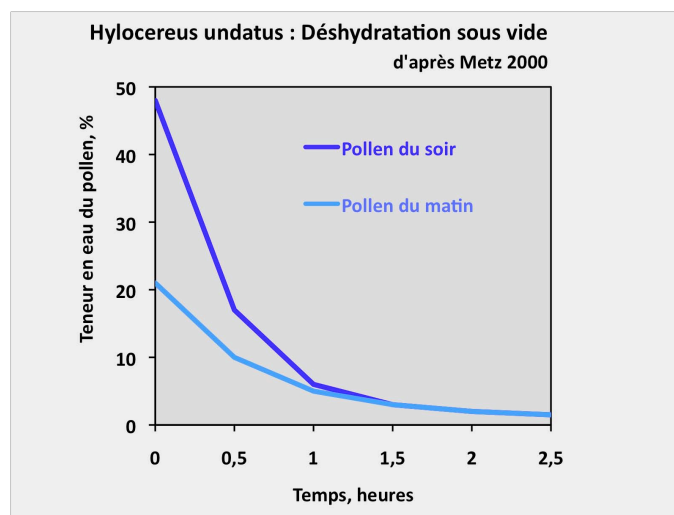
Elle a été pratiquée dans un dessiccateur sous vide partiel (une demi-atmosphère ou -50 kPa ou encore -38 cm de mercure par rapport à la pression atmosphérique moyenne). Le récipient contient des cristaux de gel de silice pour adsorber l'eau. Les pollens y séjournent deux heures et demie avant d'atteindre une teneur en eau d'environ 2%, quels que soient le genre ou l'heure de la récolte.

## La conservation

Dans cette expérience, les pollen ont été conservés à plusieurs températures : +4 au réfrigérateur, -18°C et -70°C en congélateurs et -196°C dans l'azote liquide pendant 3 mois et 9 mois. Seuls les résultats de 9 mois sont rapportés ici.

## La fécondation

La réhydratation du pollen se fait naturellement par contact avec le stigmate. Les fleurs pollinisées ont été fécondées à 100% pour les pollens congelés et seulement à 60% avec les pollens conservés à +4°C.



## La fructification

Pour les température -18°C et -70°C, le poids des fruits produits (pitayas) a été le même que ceux récoltés en vergers (410 g pour *H. undatus* et 330 g pour *H. polyrhizus*) après fécondation avec du pollen frais quel que soit le genre. Les fruits issus du pollen conservé à -196°C ont un poids supérieur de 10% environ. Les pollens conservés à +4°C ont engendré des fruits de 20 à 30% plus légers.

## Les graines

Le nombre de graines récoltées figure dans le tableau ci-contre. Ces chiffres sont la moyenne de six échantillons par lot. Les tests in vitro de germination des graines ont été conduits avec 400 graines par lot.

Température de stockage	4°C	-18	-70	-196	Pollen frais
<b>Hylocereus undatus</b>					
Graines/fruit	2538	5014	5645	6067	5998
Germination %	94	95	96	94	96
<b>Hylocereus polyrhizus</b>					
Graines/fruit	2416	5084	4784	5072	4978
Germination %	85	91	---	90	93

## Bilan

Finalement, on voit que ces conditions testées avec succès en laboratoire puis en verger sont transposables dans le cadre d'une pratique domestique. En fait, il s'agit simplement de déshydrater le pollen sous un vide partiel et de le conserver dans le congélateur ménager.

## LA TECHNIQUE VULGARISEE

Chez les amateurs de cactus, jusqu'à maintenant, les pratiques de conservation du pollen frais au réfrigérateur permettent une fécondation pendant quelques jours seulement. Cette nouvelle technique de conservation à long terme mérite d'être testée afin de permettre la fécondation ou l'hybridation d'espèces dont le décalage de floraisons s'étend sur une saison entière.

### Fabrication du dessiccateur sous vide

Nous cherchons à atteindre une pression résiduelle de 50 kilopascals, c'est à dire un demi bar. Pour ce faire, nous devons vider le récipient de la moitié de son air.

#### Version minimaliste

Pour moins de 5 euros, procurez-vous un bocal avec un couvercle hermétique et plan, une seringue dite de 50 ml en pharmacie (embout cône Luer centré ou excentré mais pas Luer Lock, environ 2€), deux valves de chambres à air (et leur vis) et deux joints toriques en caoutchouc au diamètre des valves.

- Percer le couvercle au diamètre des valves.
- Enfiler le joint torique jusqu'à l'embase de la valve.
- Mettre une valve tête en bas et l'autre tête en haut. Celle qui sera à l'intérieur du bocal doit être dévissée pour permettre de pomper l'air et celle qui sera sur le couvercle sera vissée et ne servira qu'à faire pénétrer l'air dans le bocal après déshydratation.
- Il ne reste plus qu'à pomper avec la seringue. Il sera peut-être nécessaire de recouvrir l'embout de la seringue d'un tuyau souple qui assurera une bonne étanchéité entre la seringue et la valve.
- Il faudra pomper plusieurs fois en appliquant l'embout de la seringue (piston enfoncé) sur la partie en caoutchouc de la valve intérieure émergeant du couvercle.

Là, il faut tirer brutalement sur le piston tout en maintenant le corps de la seringue, puis, en même temps que le piston arrive en haut, il faut retirer la seringue de la partie en caoutchouc assez vivement pour que l'air qui va vouloir entrer dans le bocal repousse le clapet de la valve et l'obstrue. Il est nécessaire de recommencer plusieurs fois l'opération. Compte tenu des inévitables fuites et de la réactivité des valves, j'ai enlevé 180 ml d'air pour un bocal de 240 ml, soit 75% du volume pour arriver à une pression de -38 cm de mercure, mesurée au vacuomètre.

#### Version caviste

La seringue peut être utilement remplacée par une pompe à faire le vide dans les bouteilles de vin entamées. La pompe, et son bouchon réutilisable, se vendent entre 15 et 20€. Il suffit d'adapter le bouchon sur le couvercle du récipient. Une



jonction/compression de chez Leroy-Merlin (à moins de 2€) permet d'avoir deux adaptateurs qu'il suffit de coller sur le couvercle avec de l'Araldite. Le vide à -50 kPa est rapidement atteint.

### **Version industrielle**

Une solution plus efficace, lorsque les pollens à stocker se succèdent quotidiennement, consiste à électrifier le système.

Un groupe frigo récupéré sur un vieux réfrigérateur ou un congélateur constitue une excellente pompe à vide. Quelques secondes suffisent à atteindre une dépression de -38 cm de mercure.

## **Collecte du pollen**

### **L'entonnoir**

Le pollen est récolté dans un sachet en papier cristal. Pour les grosses fleurs (*Epiphyllum*, *Selenicereus* et certains *Echinopsis*), la collecte peut se faire en secouant la fleur au-dessus d'un entonnoir relié au sachet en papier cristal.

### **Les ciseaux**

Pour les autres fleurs, on peut utiliser une paire de ciseaux et couper juste au-dessous de l'anthère déhiscente. Il suffit ensuite de verser dans le sachet les anthères et le pollen restés sur les lames des ciseaux.

### **Le coton-tube**

La technique des ciseaux présente l'inconvénient d'embarquer les sacs polliniques et les restes de l'anthère avec le pollen. Cet ensemble se retrouve ensuite sur le pinceau lors de la fécondation et pourrait concurrencer l'occupation de la surface des stigmates par le pollen. Pour séparer le pollen des sacs polliniques, il faut donc que ça se fasse à la collecte par une technique d'aspiration du pollen.

Les cotons tiges sont souvent en plastique creux. La solution est simple : un coton tige = deux cotons tubes.

Ensuite, il faut avoir un dispositif d'aspiration, pompe à vide ou vieux groupe frigo, aspirateur, etc...

Il suffit alors de promener le coton tube parmi les étamines pour en aspirer le pollen. Il faut redresser le tube avant d'arrêter l'aspiration puis vider celui-ci dans un sachet et tapotant dessus, ou éventuellement en soufflant dans le coton tube avec délicatesse.



## Déshydratation du pollen

Le sachet contenant le pollen est plié et fermé avec un scotch puis mis dans le bocal dont le fond a été préalablement rempli avec un produit absorbant d'humidité.

Le vide partiel est fait dans le récipient. Le système est très hermétique car il peut conserver le même vide pendant très longtemps... autant qu'un vélo peut rester gonflé. Après 3 ou 4 heures, on considère que le pollen a atteint une teneur en eau compatible avec une congélation. On dévisse la valve et là, on entend le sifflement de l'air entrant dans le récipient. C'est aussi un moyen de vérifier que le vide avait bien été fait.



## Congélation du pollen

Les sachets de pollen sont alors stockés au congélateur dans un bocal hermétique avec des cristaux de gel de silice afin de maintenir la déshydratation.

## RESULTATS

Les essais se sont étalés sur trois années. En 2009, une fécondation avait été obtenue après 51 jours de congélation du pollen. En 2010, jusqu'à 129 jours de congélation. En 2011, des fécondations, surtout sur Echinopsis, ont été obtenues après 415 jours de congélation.

## Influence de la longévité du stockage du pollen sur le nombre de graines produites

Les graines de la campagne 2011 sont séparées en deux lots selon que le pollen congelé est de 2010 ou de 2011. Celui de 2011 subit systématiquement une déshydratation et 3 ou 4 heures et une congélation d'une nuit au minimum. Il y a 19 données pour 2011 et 23 pour 2010.

L'estimation du nombre de graines a été faite par la technique assistée par ordinateur précédemment décrite sur le forum du Cactus Francophone :

<http://www.cactuspro.com/forum/read.php?1,384536,384536#msg-384536>

Les résultats détaillés sont accessibles ici :

<http://www.cactuspro.com/forum/read.php?1,394776>

Les moyennes  $\pm$  écarts types de la population sont respectivement de :  
 pollen 2010 = 330  $\pm$  311 et pollen 2011 = 559  $\pm$  672

Au vu de l'hétérogénéité des données, les différences ne sont pas significatives, mais il ne serait pas surprenant que l'allongement de la durée du stockage diminue l'efficacité de la fécondation ; ne serait-ce que parce que les sachets sortent plusieurs fois de congélateur, le temps d'y plonger le pinceau.

### Influence d'un vide plus poussé sur le nombre de graines produites.

Dans leur publication, Metz *et al.* recommandent un vide de -0,5 atmosphère. Il était intéressant de voir si l'amateur pouvait se dispenser d'un vacuomètre pour apprécier la dépression dans son récipient de déshydratation.

Les pollens ont été prélevés, ensachés et déshydratés sous un vide poussé entre -0,88 et -0,92 atmosphère pendant 3 à 4 heures, puis congelés. Douze fleurs ont été fécondées avec ces pollens et la moitié d'entre elles n'ont pas fait de fruit.

Ces résultats sont à comparer avec les résultats des fécondations obtenues avec le pollen 2011 (lien précédent) qui lui, était déshydraté sous -0,50 atmosphère.

La sensibilité au vide poussé n'est peut-être pas la même pour toutes les espèces. On constate que *Echinopsis* sp. fleur jaune semble très sensible, ce qui n'est pas le cas pour *Harrisia* sp.

MERE		PERE		POLLEN CONGELE VIDE 0,88 à 0,92			Nb
Genre	Espèce	Genre	Espèce	Recolte	Fecond.	Jours	graines
Echinopsis	sp fleur jaune	Echinopsis	cv Terra Cota	22/06/11	24/08/11	59	394
Echinopsis	sp fleur jaune	Echinopsis	fleur blanche DM	23/06/11	12/08/11	47	0
Echinopsis	oxygona	Echinopsis	fleur blanche DM	23/06/11	24/08/11	62	0
Echinopsis	sp fleur jaune	Echinopsis	fleur blanche DM	23/06/11	12/08/11	50	517
Echinopsis	leucantha	Harrisia	sp	23/06/11	27/07/11	34	2050
Echinopsis	oxygona	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	23/06/11	1	0
Echinopsis	oxygona	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	24/09/11	2	0
Echinopsis	cv Terra Cota	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	24/09/11	2	0
Echinopsis	cv rose MAD	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	25/06/11	3	0
Echinopsis	oxygona	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	24/08/11	59	33
Echinopsis	oxygona	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	24/07/11	32	32
Echinopsis	cv rose MAD	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	24/08/11	59	51

Ce n'est certainement pas par hasard que l'équipe de Metz a fixé la valeur du vide à -0,5 atmosphère. Il semble bien qu'il y ait un effet délétère sur le pollen et il est donc indispensable de s'équiper d'un vacuomètre afin de stabiliser le vide à -0,50 atmosphère. Il en coûte 18,50 € chez Conrad :

[http://www.conrad.fr/vacuometre\\_p\\_48674\\_49891\\_607138\\_1010523\\_FAS](http://www.conrad.fr/vacuometre_p_48674_49891_607138_1010523_FAS)

## Vérifier si la technique de collecte du pollen influence la qualité de la fécondation

Dans un premier temps, la collecte du pollen s'effectuait en coupant aux ciseaux la partie supérieure des étamines avec leur sac pollinique. L'hypothèse d'une compétition des débris des étamines mélangés à ceux des sacs polliniques avec le pollen sur le stigmate a conduit à comparer "aspiration" et "ciseaux" sur le nombre de graines par fruit.

Le pollen a donc été, soit aspiré sur une fleur, soit collecté avec des ciseaux sur une autre fleur de la même plante, le même jour.

Les fécondations ont également eu lieu évidemment sur deux fleurs différentes d'une même plante, le même jour. La récolte des fruits de chaque plante a lieu le même jour.

MERE		PERE		POLLEN CONGELE			Nombre de graines Selon collecte du pollen	
Genre	Espèce	Genre	Espèce	Recolte	Fecond.	Jours	ciseaux	aspiration
Echinopsis	cv Paul Schmitt	Echinopsis	blanc FB	23/04/11	24/04/11	1	356	318
Echinopsis	sp fleur jaune	Echinopsis	oxygona	23/04/11	24/04/11	1	338	148
Echinopsis	sp fleur jaune	Echinopsis	rose MAD	23/04/11	24/04/11	1	361	313
Echinopsis	oxygona	Echinopsis	blanc FB	23/04/11	24/04/11	1	651	582
Echinopsis	rose MAD	Echinopsis	sp fleur jaune	23/04/11	24/04/11	1	319	365
Echinopsis	sp fleur jaune	Echinopsis	cv Terra Cota	23/04/11	22/05/11	29	381	311

Certes, c'est sur un petit nombre mais on constate que l'hypothèse de départ n'était pas fondée car dans le cas présent constitué uniquement d'Echinopsis, les fécondations par le pollen collecté avec des ciseaux engendre en moyenne un peu plus de graines (400 vs 340). Les deux techniques sont donc envisageables.

## CONCLUSION

Après trois années de tests, la démonstration est faite que la technique est fiable et qu'elle est suffisamment simple pour être mise en œuvre par le collectionneur. Elle devrait permettre d'aborder des croisements intergénériques jusqu'alors impossibles du fait du décalage des floraisons.

Il y a donc là une technique d'avenir et des perspectives inédites de croisements pour les amateurs et les obtenteurs.

## BIBLIOGRAPHIE

Buitink J., Walters C., Hoekstra F.A. & Crane J., 1998a, Storage behavior of *Typha latifolia* pollen at low water contents : interpretation on the basis of water activity and glass concepts., *Physiologia Plantarum*, 103 : 145-153.

Buitink J., Claessens M.A.E., Hemminga M.A., Hoekstra F.A., 1998b, Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seed and pollen, *Plant Physiol.*, 118 : 531-541

- Buitink J., Leprince O., Hemminga M. A., Hoekstra F. A., 2000, The effects of moisture and temperature on the ageing kinetics of pollen : interpretation based on cytoplasmic mobility, *Plant, Cell & Environment*, 23, 9 : 967-974
- Cerceau-Larrival M.-Th. , Delange Y. , Youmbi E. , Derouet L. , Verhille A.-M. and Carbonnier-Jarreau M.-C., 1995, Contribution à la préservation du patrimoine génétique mâle des collections végétales vivantes du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, *Grana*, 34, 6 : 371 — 407
- Charrier A., 1990, Pollen et ressources génétiques, *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 2 : 101-104.
- Derouet M., 2010, Graines de cactées, de la fleur à la plantule, page 18.  
[http://www.cactuspro.com/articles/graines\\_de\\_cactees\\_de\\_la\\_fleur\\_a\\_la\\_plantule](http://www.cactuspro.com/articles/graines_de_cactees_de_la_fleur_a_la_plantule)
- Metz C., Nerd A., Mizrahi Y., 2000, Viability of pollen of two fruit crop cacti of the genus *Hylocereus* is affected by temperature and duration of storage, *HortScience*, 35, 2 : 199-201
- Visser T., 1955, Germination and storage of pollen, Thesis, Mededelingen van de Landbouwhogeschool 55 (1) : 68p, NL

**Summary :** Long-term storage of pollen is interesting for cacti enthusiasts seeking crosses. This paper popularize a home-made experiment based on the study developed by Metz *et al.* (2000).

To obtain an efficient preservation of viable pollen, two processes are required : first dehydration in a vacuum (about -50kPa) dessicator at room temperature until the moisture content is reduced to 5% (about 3 hours) and second, storage at subfreezing temperature. In practice, the vacuum is performed by syringe, vacuum wine saver pump or refrigerating unit and the storage in a household freezer. For pollination, the pollen is applied to mature stigmas able to rehydrate the dried pollen. Under these conditions, we obtain fruits and seeds after one year of storage.

**Key words :** cactus, pollen, seed, dehydration, dessiccation, conservation, freezing

Je remercie Georges Marchand et Jean-Didier Hary pour leur amicale collaboration.

Michel Derouet  
michelderouet@orange.fr  
8 novembre 2011