

Première vérification de l'influence des fongicides sur la pollinisation du fraisier
(projet # 130)

PRAH
(Programme sur la Recherche Appliquée en Horticulture)

Rapport de recherche

Présenté par

Johanne Caron & Lucie Laverdière
Horti-Protection inc.

Requérant

Association des producteurs de fraises et framboises du Québec

Mars 2000

“ Note : les résultats, opinions et recommandations contenus dans ce rapport sont ceux des auteurs. Ils n’engagent aucunement le Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation du Québec ”.

Résumé

La valeur économique des récoltes de fraises dépend de la qualité des fruits (absence de pourriture, volume, symétrie ou absence de difformité, etc....) et du rendement qui sont dépendant du pourcentage de pistils pollinisés (200 à 450 pistils par fleur). Généralement, la punaise terne et le manque de pollinisateurs (espèces et nombre présents, conditions climatiques défavorables) sont accusés pour les fruits petits ou difformes. La majorité des pourritures de fruits observées en pré ou post-récolte proviennent des infections des fleurs par *Botrytis cinerea*. Les producteurs doivent donc traiter avec les fongicides, 2 à 3 fois durant la floraison. Plusieurs études ont démontré, sur d'autres cultures (pomme, pêche, bleuet, canneberge), que certains fongicides étaient toxiques à la germination du pollen et diminueraient plus ou moins les rendements et la qualité des fruits. Chez la fraise et la framboise, cet impact pourrait être beaucoup plus important compte tenu du grand nombre de pistils (ovaires) à féconder pour donner un beau fruit : environ 50 pour la framboise et 200 à 450 chez la fraise, comparé à moins de 10 pour la pomme, la poire, le bleuet ou la canneberge.

Huit des douze études sur la phytotoxicité des fongicides à l'égard du pollen furent réalisées sur le pommier, une sur le bleuet et une sur la canneberge. Les deux autres concernent le poirier et la pomme de terre. Parmi les fongicides pouvant être utilisés au Québec sur la fraise au stade floraison, seuls le captane et le bénomyl furent testés (pomme, poire); le captane s'étant montré très toxique et le bénomyl inoffensif à ces pollens. Les autres fongicides étudiés ne sont pas homologués en culture de fruits au Canada; certains sont toxiques à divers pollens, d'autres pas. Il importait donc de vérifier tous nos fongicides homologués au Québec sur la fraise.

Un milieu de culture a été adapté pour permettre la germination du pollen de fraisier. L'étude de différents paramètres a permis de déterminer que : **1)** le milieu de culture doit contenir les ingrédients suivants (par litre de milieu) : 15% de sucrose, 100 ppm d'acide borique, 300 ppm de nitrate de calcium, 200 ppm de sulfate de magnésium, 100 ppm de nitrate de potassium, 1.5% d'agar et le pH du milieu, avant l'ajout de l'agar, devrait être ajusté à 5,8. **2)** le pollen doit être frais et jeune (une journée après l'ouverture de la fleur) et qu'il doit être déposé sur le milieu de culture sous forme d'une suspension de pollen. **3)** le pollen doit être hydraté pendant 1 heure avant sa mise sur milieu de culture sous forme d'une suspension. **4)** les milieux de culture ensemencés avec le pollen doivent être incubés à 24°C, à la noirceur, pendant 22 - 24 heures. **5)** Le pollen peut être conservé à 4°C, dans un dessiccateur. **6)** le taux moyen de germination est de 45%.

Les études de nocivité des fongicides envers le pollen de fraisier ont été faites en transférant du pollen frais sur un milieu nutritif solide contenant le fongicide à étudier et en évaluant le taux de germination du pollen. Lorsque les doses recommandées au champ sont employées *in vitro*, aucun pollen ne germe. Par contre, à 10 ppm, les fongicides peuvent être classifiés en trois catégories : **1)** Les fongicides toxiques : les captanes (Captan 50W, Captan 80W, Supra Captan 80 WDG et Maestro). Le Folpan ne permet également aucune germination. **2)** Les fongicides présentant une certaine toxicité. Le Cuivre 53M, la chaux soufrée et l'Equal composent ce groupe. Dans ces cas, le taux de germination a varié entre 1 et 15%. **3)** Les fongicides compatibles avec le pollen de fraisier. Le Benlate, le Rovral, Easout, le Ronilan et le Savon Safer's seraient parmi les meilleurs fongicides à employer à la floraison.

Liste des personnes ayant participé au projet

Requérant : *Association des producteurs de fraises et framboises du Québec inc.*
M. Louis Gosselin, vice-président
555, Roland-Therrien
Longueuil, Québec
J4H 3Y9
Tél. : (418) 828-2866 ou (450) 679-0540
Fax : (418) 828-2866 ou (450) 679-2375

Exécutant : *Horti-Protection inc.*
Mme Johanne Caron et Lucie Laverdière
11, des Peupliers
Sainte-Hélène de Breakeyville, Québec
G0S 1E1
Tél. et fax : (418) 832-0546
hortipro@mediom.qc.ca

Coordonateur : *Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA)*
M. Pierre O. Thibodeau, agronome-phytopathologiste
2 700, rue Einstein
Sainte-Foy, Québec
G1P 3W8
Tél. : (418) 644-7226
Fax : (418) 644-6855
Pierre.Thibodeau@irda.qc.ca

Collaborateur : *Réseau de Lutte Intégrée Orléans inc. (RLIO)*
M. Patrice Thibault, agronome
106, rue Licorne
Beauport, Québec
G1C 7E6
Tél. : (418) 563-9649
Fax : (418) 660-5538

Personnel technique : *Mme Caroline Thibault, technicienne*

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	2
Liste des personnes ayant participé au projet	3
Liste des tableaux.....	5
1. Introduction.....	6
2. Matériel et Méthodes.....	7
2.1 Informations pertinentes sur le pollen de fraisier	7
2.1.1 <i>Type de pollen</i>	7
2.1.2 <i>Origine du pollen</i>	7
2.1.3 <i>Conservation du pollen</i>	7
2.1.4 <i>Âge du pollen</i>	7
2.2 Facteurs à considérer pour favoriser la germination du pollen de fraisier.....	7
2.2.1 <i>Hydratation du pollen</i>	7
2.2.2 <i>Quantité et façon de déposer le pollen sur le milieu de culture</i>	8
2.2.3 <i>Effet de la lumière et de la noirceur sur la germination du pollen</i>	8
2.3 Mise au point d'un milieu nutritif efficace pour la germination du pollen de fraisier	8
2.3.1 <i>Influence du pH du milieu de culture sur la germination du pollen</i>	8
2.3.2 <i>Influence de la concentration de sucrose sur la germination du pollen</i>	9
2.4 Essais de toxicité des fongicides envers le pollen	9
2.4.1 <i>Incorporation des fongicides au milieu selon les concentrations recommandées au champ</i>	9
2.4.1.1 <i>Incorporation des fongicides au milieu selon les concentrations recommandées au champ</i>	9
2.4.2 <i>Incorporation des fongicides au milieu à des concentrations de 10, 100 et 1000 ppm</i>	10
2.4.3 <i>Incorporation des fongicides au milieu de culture à la concentration de 10 ppm</i>	10
3. Résultats et discussion.....	11
3.1 Hydratation du pollen réfrigéré	11
3.2 Détermination de la quantité de pollen à mettre sur le milieu de culture.....	11
3.3 Influence du pH du milieu de culture sur la germination du pollen	12
3.4 Influence de la concentration de sucrose sur la germination du pollen.....	13
3.4.1 <i>Variation de la quantité de sucrose dans le milieu de culture</i>	13
3.4.2 <i>Variation de la quantité de sucrose et de l'influence de la lumière et de la noirceur sur la germination du pollen</i>	14
3.4.3 <i>Variation de la quantité de sucrose, de l'influence de la noirceur sur la germination du pollen frais et du pollen réfrigéré</i>	14
3.5 Essais avec les pesticides.....	15
3.5.1 <i>Incorporation des fongicides au milieu selon les concentrations recommandées au champ</i> ...	15
3.5.2 <i>Incorporation des fongicides au milieu de à des concentrations de 10, 100 et 1000 ppm</i>	16
3.5.3 <i>Incorporation des fongicides au milieu de culture à la concentration de 10 ppm</i>	17
4. Conclusion.....	18
5. Activités de diffusion réalisées et à venir.....	19
6. Bibliographie	20

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Influence du temps d'hydratation du pollen sur son pouvoir germinatif.....	11
Tableau 2. Influence du temps d'hydratation prolongé sur la germination du pollen.....	11
Tableau 3. Influence de la quantité de pollen à mettre sur le milieu nutritif pour avoir le meilleur taux de germination du pollen.....	12
Tableau 4. Influence du pH sur la germination du pollen de fraisier.....	12
Tableau 5. Influence du pH sur la germination du pollen frais et du pollen réfrigéré de fraisier.....	13
Tableau 6. Influence de la concentration de sucrose sur la germination du pollen de fraisier.....	14
Tableau 7. Influence de la concentration de sucrose et de l'influence de la lumière et de la noirceur sur la germination du pollen de fraisier.....	14
Tableau 8. Influence de la concentration de sucrose et de l'influence de la noirceur sur la germination du pollen frais et du pollen réfrigéré.....	15
Tableau 9. Détermination du pourcentage moyen de germination du pollen de fraisier avec tous les paramètres sélectionnés.....	15
Tableau 10. Détermination du pourcentage de germination du pollen de fraisier lorsque traité avec des fongicides utilisés aux concentrations du champ.....	16
Tableau 11. Détermination du pourcentage de germination du pollen frais de fraisier déjà traité sur la fleur, au stade de l'anthèse, avec des fongicides utilisés aux concentrations du champ.....	16
Tableau 12. Détermination du pourcentage de germination du pollen de fraisier lorsque traité avec des fongicides aux concentrations de 10, 100 et 1000 ppm.....	16
Tableau 13. Détermination du pourcentage de germination du pollen de fraisier lorsque traité avec des fongicides aux concentrations de 10 ppm.....	17

Première vérification de l'influence des fongicides sur la pollinisation du fraisier

1. INTRODUCTION

D'une part, la valeur économique des récoltes de fraises dépend de la qualité des fruits (absence de pourriture, volume, symétrie ou absence de difformité, etc....) et du rendement qui sont dépendant du pourcentage de pistils pollinisés (200 à 450 pistils par fleur). Généralement, la punaise terne et le manque de pollinisateurs (espèces et nombre présents, conditions climatiques défavorables) sont accusés pour les fruits petits ou difformes. D'autre part, 60% et plus des pourritures de fruits en pré ou post récolte proviennent des infections des fleurs par *Botrytis cinerea*. Les producteurs doivent donc traiter avec les fongicides 2 à 3 fois durant la floraison. Plusieurs études ont démontré, sur d'autres cultures (pomme, pêche, bleuet, canneberge), que certains fongicides sont toxiques à la germination du pollen et diminueraient plus ou moins les rendements et la qualité des fruits. Chez la fraise et la framboise, cet impact pourrait être beaucoup plus important compte tenu du grand nombre de pistils (ovaires) à féconder pour donner un beau fruit : environ 50 pour la framboise et 200 à 450 chez la fraise, comparé à moins de 10 pour la pomme, la poire, le bleuet ou la canneberge.

Huit des douze études sur la phytotoxicité des fongicides à l'égard du pollen furent réalisées sur le pommier, une sur le bleuet et une sur la canneberge. Les deux autres concernent le poirier et la pomme de terre. Parmi les douze fongicides (quinze formulations) pouvant être utilisés au Québec sur la fraise au stade floraison, seuls le captane et le bénomyl furent testés (pomme, poire); le captane s'étant montré très toxique et le bénomyl inoffensif à ces pollens. Les autres fongicides étudiés ne sont pas homologués en culture de fruits au Canada; certains sont toxiques à divers pollens, d'autres pas. Il importe donc de vérifier tous nos fongicides homologués au Québec sur la fraise.

Les études de nocivité des produits envers le pollen sont réalisées de trois façons : 1- Transfert du pollen frais sur milieu nutritif liquide ou solide contenant le fongicide à étudier et observation de la germination. 2- Pulvérisation du fongicide sur les fleurs, puis, transfert du pollen traité sur milieux nutritifs. 3- Pulvérisation du fongicide sur les fleurs et observation du développement des fruits. Les études sur la germination du pollen démontrent la complexité des milieux nutritifs et leur variation en fonction des espèces étudiées pour l'obtention d'un pourcentage de germination intéressant. Généralement les éléments suivants sont requis, à différentes concentrations, selon les espèces : agar, acide borique et sucrose. L'ajout de calcium, de potassium, de magnésium et de certains autres produits est souvent désirable. Le pourcentage de germination maximaux obtenus varient de 35 à 89% selon les espèces. Généralement, les essais sont réalisés à des températures variant de 20 à 26°C et à des pH entre 5,5 et 7,0. Cette complexité démontre donc qu'il est nécessaire, à partir des milieux déjà élaborés, de mettre au point un milieu favorable à la germination du pollen de fraisier avant de procéder aux essais de toxicité. Le cultivar «Seascape» se prête bien à cette première étape car, étant un cultivar à jour neutre, sa floraison est continue assurant la disponibilité en pollen frais tout au long des essais.

Objectifs

1. Mettre au point un milieu nutritif favorable à la germination du pollen de fraisier afin de permettre l'évaluation de la toxicité des produits (pesticides) envers ce pollen.
2. Évaluer les 14 fongicides utilisés en fraisières pour leur toxicité à l'égard du pollen de fraisier afin de ne recommander que les moins nocifs au moment de la floraison, dans la lutte contre le *Botrytis cinerea*.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Informations pertinentes sur le pollen de fraisier

2.1.1 Type de pollen

Les grains de pollen sont divisés en deux catégories : 1) les bicellulés (vie longue du pollen; > 6 mois) et 2) les tricellulés (vie courte du pollen; < 6 mois). Ces derniers sont reconnus comme étant les plus difficiles à faire germer *in vitro*. Heureusement, le pollen de fraisier fait partie des bicellulés. Le pollen de fraisier, lorsqu'il est viable, prend une forme sphérique et lorsqu'il est stérile, il a une forme irrégulière ou atrophiée. Le pollen est considéré germé lorsque le tube pollinique est plus grand que le diamètre du grain de pollen.

2.1.2 Origine du pollen

Le pollen utilisé pour les différents tests provient de plants de fraisier à jour neutre du cultivar «Seascape». Dans un premier temps, du pollen a été récolté au champ puis réfrigéré à 4°C. Il sera appelé " pollen réfrigéré ". D'autres tests ont été faits avec du pollen frais recueilli directement sur des plants de fraisier à jour neutre (Seascape) cultivés en serre. Il portera l'étiquette de " pollen frais ".

2.1.3 Conservation du pollen

Selon la littérature, le pollen du fraisier peut être conservé à 4°C pendant trois ans. Sa viabilité est assurée lorsque le pollen est gardé à basse humidité relative (entre 10 et 30%) et en présence d'un agent dessiccant comme la drierite. La meilleure façon de conserver et d'assurer la viabilité du pollen est de le déposer dans une fiole de verre qui possède un bouchon ajouré, permettant un échange gazeux. Cette fiole est ensuite déposée dans un dessiccateur contenant de la drierite.

2.1.4 Âge du pollen

En serre, le pollen a été récolté et classifié selon la date d'ouverture de la fleur soit **1) le pollen jeune** est celui qui est présent le jour suivant l'ouverture de la fleur et dont les anthères sont rendues brunâtres. Le pollen dans ce cas est assez abondant. **2) Le pollen d'âge moyen** est présent deux jours après l'ouverture de la fleur et les anthères sont de couleur noirâtre. Le pollen est abondant. **3) Le vieux pollen** est celui récolté 3 à 4 jours après l'ouverture de la fleur. Les anthères sont noires et les pétales sont flétris. Le pollen est alors très abondant.

2.2 Facteurs à considérer pour favoriser la germination du pollen de fraisier

2.2.1 Hydratation du pollen

Le taux de germination du pollen est fortement influencé par l'hydratation que le pollen subit avant son utilisation. L'hydratation doit être graduelle et faite dans un environnement humide. Différents tests ont été faits afin de déterminer le temps d'hydratation requis pour déclencher la germination du pollen. Des temps de 15, 30, 45, 60 min, 12 heures et un témoin sec (pollen déposé directement sur la gélose) ont été vérifiés. Le pollen réfrigéré a servi pour ces tests. Il a été déposé dans un verre de montre et placé dans un plat de Pétri contenant un papier filtre humide. Le pollen a été incubé, selon les

différents temps à l'étude, dans un gerموir à 24°C, 100% d'humidité relative. Trois Pétri par traitement ont été faits. Après les différents temps d'hydratation respectifs, le pollen a été déposé sur un milieu nutritif pour le pollen et le taux de germination a été noté.

2.2.2 Quantité et façon de déposer le pollen sur le milieu de culture

Le taux de germination du pollen serait dépendant de la quantité de pollen présent sur le milieu de culture. L'effet de groupe serait important i.e. plus le pollen est regroupé, meilleure serait la germination. Différentes quantités de pollen ont été évaluées soit 1, 2, 3, 4 ou 5 pincées de pollen prélevées à l'aide d'une pince fine et déposé soit directement sur la gélose ou mis dans un millilitre d'eau, pour former une suspension. Avant d'ensemencer le milieu de culture, 100 µl d'eau distillée stérile + tween 80 ont été déposés sur la gélose et étalés afin de bien humidifier la surface réceptrice au pollen. Ensuite, 50 µl de la suspension de pollen ont été déposés dans le haut d'un milieu de culture. Les plats de Pétri ont ensuite été déposés sur un grillage légèrement incliné, permettant à la suspension de pollen de descendre sur la gélose, par gravité, répartissant ainsi le pollen plus uniformément.

2.2.3 Effet de la lumière et de la noirceur sur la germination du pollen

L'influence de la lumière et de la noirceur sur la germination du pollen a été vérifiée en laboratoire en même temps que les essais portant sur différentes doses de sucrose à ajouter au milieu de culture. Du pollen frais a été employé pour ce test. Le pollen a été placé soit 1) dans un incubateur (24°C), à la noirceur; 2), à la température de la pièce (22-24°C) à la lumière ou 3) à la température de la pièce (22-24°C), à la noirceur. Le pollen a subi une hydratation d'une heure avant la mise sur milieu de culture. La quantité de pollen employée était de 5 pincée de pollen dans 1 ml d'eau distillée stérile. Trois Pétri par traitement ont été faits.

2.3 Mise au point d'un milieu nutritif efficace pour la germination du pollen de fraisier

D'après la revue de littérature, les milieux de culture utilisés pour la germination du pollen de différentes espèces végétales comprennent généralement, à différentes concentrations, les ingrédients suivants : de l'agar, du sucrose, de l'acide borique, du nitrate de calcium, du sulfate de magnésium et du nitrate de potassium. Afin d'obtenir le meilleur taux de germination du pollen et le développement optimal du tube pollinique, plusieurs tests ont été effectués afin de déterminer les concentrations optimales des différents ingrédients. Le milieu de culture mis au point a tiré son inspiration du milieu de base de Brewbaker et Kwack (1963). Ce milieu de base comprenait : 10% de sucrose, 100 ppm d'acide borique, 300 ppm de nitrate de calcium, 200 ppm de sulfate de magnésium, 100 ppm de nitrate de potassium et 1.5% d'agar. Une attention particulière a également été portée au pH du milieu de culture.

2.3.1 Influence du pH du milieu de culture sur la germination du pollen

Le pH du milieu de culture a été ajusté avant la stérilisation du milieu. Dans cette étude, le pH a varié entre 5.7 et 8.5. Le pollen a été hydraté durant une heure avant son utilisation. Cinq pincées de pollen ont été mis dans 5 ml d'eau distillée stérile + tween 80 et la suspension a été homogénéisée. Chaque plat de Pétri a reçu 50 µl de la suspension de pollen. Le taux de germination du pollen a été noté à toutes les heures pendant six heures. Trois Pétri par pH ont été évalués.

2.3.2 Influence de la concentration de sucrose sur la germination du pollen

La concentration de sucrose dans le milieu a varié entre 10 et 20%. Une attention particulière a été portée au sucrose, puisqu'il semble être, selon la littérature, l'ingrédient le plus important dans le milieu de culture, avec le calcium. La variation de la concentration de sucrose dans le milieu a été faite en relation : **1**) avec les différents types de pollen (jeune, moyen et vieux), **2**) avec l'influence de la lumière et de la noirceur sur le taux de germination du pollen et **3**) avec le pollen frais et réfrigéré. Le pollen a subi une hydratation pendant une heure avant son utilisation. Dans un des tests, le pollen a été déposé directement sur la gélose ou sous forme de suspension de pollen. Dans ce cas, cinq pincées de pollen ont été mis dans 5 ml d'eau distillée stérile + tween 80 et la suspension a été homogénéisée. Chaque Pétri a reçu 50 µl de la suspension.

2.4 Essais de toxicité des fongicides envers le pollen

Les différents fongicides suivants ont été utilisés pour vérifier leur toxicité envers le pollen :

Benlate (bénomyl)	Folpan 50 WP (folpet)
Bravo 500 (chlorotalonil)	Lime Sulfur 22% (chaux soufrée)
Captan 50W (captane)	Maestro 75 DF (captane)
Captan 80W (captane)	Ronilan EG (vinclozoline)
Cuivre 53M (Sulfate de cuivre tribasique)	Rovral (iprodione)
Easout (thiophanate-méthyl)	Savon insecticide Safer's (savon insecticide)
Equal 65W (dodine)	Supra Captan 80 WDG (captane).

Pour effectuer les tests de toxicité, le milieu utilisé était composé de : 15% de sucrose, 100 ppm d'acide borique, 300 ppm de nitrate de calcium, 200 ppm de sulfate de magnésium, 100 ppm de nitrate de potassium et 1.5% d'agar. Le fongicide est incorporé au milieu de culture après l'étape de stérilisation du milieu.

2.4.1 Incorporation des fongicides au milieu de culture selon les concentrations recommandées au champ

Les fongicides testés à cette étape étaient : Benlate (1.1 kg/1000 l), Captan 50W (4.50-6.50 kg/1000 l), Cuivre fixe 53M (2.50-3.80 kg/1000 l), Ronilan (2 kg/1000 l), Rovral (2 kg/1000 l) et un témoin. Dix Pétri par traitement ont été faits. Les plats de Pétri ont été incubés à 24°C, à la noirceur, pendant 22 heures. Le pourcentage de germination du pollen a été évalué.

2.4.1.1 Incorporation des fongicides au milieu selon les concentrations recommandées au champ

Le même test a été refait mais en pulvérisant le Benlate et le Captan 50W directement sur les fleurs de fraisier, en serre, selon la dose recommandée au champ. Les fleurs ont été marquées au stade " bouton blanc " et suivi jusqu'à l'ouverture de la fleur. Dès l'ouverture de la fleur, le début de la formation du pollen et la réceptivité des anthères ont été observés à la loupe binoculaire. Le traitement a alors eu lieu une journée après l'ouverture de la fleur afin d'avoir du pollen jeune. Immédiatement après le traitement, les hampes florales ont été recouvertes d'un sac de plastique

(100% humidité) pendant 2 ou 4 heures et placées à la noirceur. Le pollen a ensuite été récupéré et déposé sur un milieu de culture, ne contenant aucun fongicide, après avoir subi une hydratation de 1 heure. Chaque traitement comportait trois hampes florales.

2.4.2 Incorporation des fongicides au milieu de culture à des concentrations de 10, 100 et 1000 ppm

Les fongicides testés à cette étape étaient : Benlate (1.1 kg/1000 l), Rovral (2 kg/1000 l) et un témoin. Dix Pétri par traitement ont été faits. Les plats de Pétri ont été incubés à 24°C, à la noirceur, pendant 22 heures. Le pourcentage de germination du pollen a été évalué.

2.4.3 Incorporation des fongicides au milieu de culture à la concentration de 10 ppm

Les fongicides testés à cette étape étaient :

Benlate (1.1 kg/1000 l)	Folpan (2.00 Kg/1000 l)
Bravo (3.5 l/1000 l)	Lime Sulfur (15 l/1000 l)
Captan 50W (4.5-6.5 Kg/1000 l)	Maestro (3.00-4.50 Kg/1000 l)
Captan 80W (2.75-4.00 Kg/1000 l)	Ronilan (2.00 Kg/1000 l)
Cuivre 53M (2.50-3.80 Kg/1000 l)	Rovral (2 kg/1000 l)
Easout (1.10 Kg/1000 l)	Savon insecticide Safer's (20 l/1000 l)
Equal (1.75-2.25 Kg/2000 l)	Supra Captan 80 WDG (2.80-4.20 Kg/1000 l)
Témoin.	

Dix Pétri par traitement ont été faits. Les plats de Pétri ont été incubés à 24°C, à la noirceur, pendant 22 heures. Le pourcentage de germination du pollen a été évalué.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Comme différents tests ont été faits simultanément, il est difficile d'analyser séparément les différentes expériences. Par exemple, le pH du milieu a été déterminé en même temps que la quantité de pollen à déposer sur la gélose; la quantité de sucrose à mettre dans le milieu de culture a été déterminée en même temps que l'influence de la lumière et de la noirceur sur la germination du pollen, etc.... Les différents points étudiés sont présentés selon l'ordre le plus logique mais tout en divulguant, parfois, de l'information qui sera détaillée plus loin.

3.1 Hydratation du pollen réfrigéré

Lorsque le pollen est hydraté durant 60 min et qu'il est ensuite déposé sur un milieu nutritif, il initie sa germination après 2 heures, contrairement aux autres périodes de temps (tab. 1). Le témoin sec débute sa germination seulement après 4 heures. Une seconde expérience a été faite afin de déterminer si une plus longue période d'hydratation pouvait être souhaitable (tab. 2). Après 12 heures, les grains de pollen étaient tous éclatés (trop turgescents??). Le meilleur temps d'hydratation est demeuré 60 min.

Tableau 1. Influence du temps d'hydratation du pollen sur son pouvoir germinatif.

Temps d'hydratation du pollen (min)	Après 1 heure	Après 2 heures	Après 3 heures	Après 4 heures
15	-	-	+	+
30	-	-	+	+
45	-	-	+	+
60	-	+	+	+
Témoin	-	-	-	+

Tableau 2. Influence du temps d'hydratation du pollen sur son pouvoir germinatif - 2^{ème} expérience.

Temps d'hydratation du pollen	Après 1 heure	Après 2 heures	Après 3 heures	Après 4 heures	Après 5 heures	Après 6 heures
15 min	-	-	-	+	+	++
30 min	-	-	-	+	+	++
45 min	-	+	+	++	++	++
60 min	+	+	++	+++	+++	++++
12 heures	-	-	-	-	-	-
Témoin	-	+	+	++	++	+++

3.2 Détermination de la quantité de pollen à mettre sur le milieu de culture

Des tests ont été faits en laboratoire afin de déterminer la quantité de pollen à mettre sur la gélose et sur la façon de déposer le pollen sur le milieu nutritif. Du pollen frais a été utilisé pour ce test. Après quelques essais, il est ressorti que 5 pincées de pollen devaient être déposées dans 1 ml d'eau distillée + tween 80 (tab. 3). Ensuite, 50 % de la suspension de pollen devaient être déposés sur le milieu de culture. Le

comptage des grains de pollen germés est alors facilité. Le pollen germé se retrouve habituellement dans le bas du milieu nutritif.

Tableau 3. Influence de la quantité de pollen à mettre sur le milieu nutritif pour avoir le meilleur taux de germination du pollen.

Quantité de pollen (# pincée / ml)	Après 1 heure	Après 2 heures	Après 3 heures	Après 4 heures
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	++	++	++
5	-	+++	+++	+++
6	-	+	+	+

3.3 Influence du pH du milieu de culture sur la germination du pollen

La première expérience a été faite avec du pollen réfrigéré non hydraté avant son utilisation. Le tableau 4 indique les résultats obtenus. Lorsque le pH du milieu est trop acide, le milieu demeure liquide. La viabilité ou l'hydratation du pollen réfrigéré ont été remis en cause dans ce test. Nous avons décidé de refaire le test en comparant le pollen frais et le pollen réfrigéré préalablement hydratés (tab. 5). Les résultats obtenus démontrent qu'un pH de 5,8, jumelé à du pollen frais mis en suspension, donnait le meilleur résultat. Après 5 heures de croissance, la germination était évidente.

Tableau 4. Influence du pH sur la germination du pollen de fraisier.

pH	Observations
7.8	Aucune croissance après 6 heures
4.2	Aucune croissance après 6 heures
2.8	Le milieu est demeuré liquide.

Tableau 5. Influence du pH sur la germination du pollen frais et du pollen réfrigéré de fraisier.

pH	Traitement*	Après 1 heure	Après 2 heures	Après 3 heures	Après 4 heures	Après 5 heures	Après 6 heures
5.8	1	-**	+	+	++	++	++
	2	+	++	++	+++	++++	++++
	3	-	-	-	-	-	-
6.5	1	-	-	-	-	+	+
	2	-	-	+	+	+	+
	3	-	-	-	-	-	+
7.2	1	-	-	-	+	++	++
	2	-	-	+	+	+	+
	3	-	-	-	-	-	-
7.5	1	-	-	-	+	+	+
	2	-	-	-	+	+	+
	3	-	-	-	-	-	+
8.1	1	-	-	-	+	+	+
	2	-	-	-	+	++	++
	3	-	-	-	-	-	-
8.5	1	-	-	-	+	+	+
	2	-	-	-	+	++	++
	3	-	-	-	-	-	+

Remarque :

- * 1 = Pollen réfrigéré mis dans de l'eau + tween 80 (1 goutte)
 2 = Pollen frais mis dans de l'eau + tween 80 (1 goutte)
 3 = Pollen frais déposé directement sur un milieu nutritif pour le pollen de fraisier.

- ** += Début de germination des grains de pollen
 ++ = 1,5 à 3 fois le diamètre des grains de pollen
 +++ = 3 à 6 fois le diamètre des grains de pollen
 ++++ = 6 fois et plus le diamètre des grains de pollen.

3.4 Influence de la concentration de sucrose sur la germination du pollen

3.4.1 Variation de la quantité de sucrose dans le milieu de culture

Le test a été fait avec les trois types de pollen frais : jeune, moyen et vieux. Lorsque le pollen est déposé directement sur le milieu de culture, il y a formation de gouttelettes d'eau sur le pollen. De plus, cette façon de faire résulte souvent en la formation d'amas de pollen, ce qui rend difficile l'estimation du pourcentage de germination du pollen. Les résultats obtenus montrent que le milieu enrichi de 150 g de sucrose permet une meilleure germination du pollen que le milieu fait avec 200 g de sucrose (tab. 6). Le jeune pollen germe également plus rapidement que le moyen et le vieux pollen. Dans cette expérience, le meilleur taux de germination est atteint après 4 heures.

Tableau 6. Influence de la concentration de sucrose sur la germination du pollen de fraisier.

Type de pollen	150 g de sucrose		200 g de sucrose	
	Direct	Suspension	Direct	Suspension
Jeune - 2 heures	+	9.4%	+	0.9%
Jeune - 4 heures	+	17.2%	+	3.8%
Moyen - 2 heures	+	4.8%	+	1.3%
Moyen - 4 heures	+	13.5%	+	6.8%
Vieux - 2 heures	+	3.4%	+	0.3%
Vieux - 4 heures	+	12.1%	+	4.0%

3.4.2 Variation de la quantité de sucrose et de l'influence de la lumière et de la noirceur sur la germination du pollen

Le test a été fait avec du jeune pollen frais. Dans ce test, 100 et 150 g de sucrose ont été ajoutés au milieu de culture. Les résultats obtenus avec 150 g de sucrose sont supérieurs à ceux obtenus avec 100 g de sucrose (tab. 7). Les milieux de culture entreposés à la noirceur germe mieux que les milieux de culture conservés à la lumière. Lorsqu'il est conservé dans un incubateur, soit un espace fermé avec une température plus uniforme, la germination est supérieure après 22 heures.

Tableau 7. Influence de la concentration de sucrose et de l'influence de la lumière et de la noirceur sur la germination du pollen de fraisier.

Temps d'observation (heure)	100 g de sucrose			150 g de sucrose		
	Incubateur noirceur (%)	T (?C) pièce lumière (%)	T (?C) pièce noirceur (%)	Incubateur noirceur (%)	T (?C) pièce lumière (%)	T (?C) pièce noirceur (%)
2	28	23	20	20	14	15
4	30	29	32	38	32	26
6	32	32	36	48	32	33
22	39	39	38	50	43	35

3.4.3 Variation de la quantité de sucrose, de la température (contrôlée et de la pièce) sur la germination du pollen frais et du pollen réfrigéré

Le test a été fait avec du jeune pollen frais et du pollen réfrigéré. Dans ce test, 150 et 175 g de sucrose ont été ajoutés au milieu de culture. Les Pétri ont été placés soit : **1**) dans un incubateur (24°C), à la noirceur ou **2**) à la température de la pièce (22-24°C), à la noirceur. Les résultats obtenus avec 150 g de sucrose sont supérieurs à ceux obtenus avec 175 g de sucrose (tab. 8). Le pollen gardé dans un incubateur, germe mieux que le pollen conservé à la température de la pièce. Le pourcentage de germination du pollen réfrigéré est légèrement supérieur au pollen frais. La germination est supérieure après 20 heures.

Tableau 8. Influence de la concentration de sucrose et de la température (contrôlée et de la pièce) sur la germination du pollen frais et du pollen réfrigéré.

Temps observation (heure)	150 g de sucrose				175 g de sucrose			
	Pollen frais		Pollen réfrigéré		Pollen frais		Pollen réfrigéré	
	Incubateur noirceur (%)	Pièce noirceur (%)						
5	0	0	0	0	0	0	0	0
18	28	29	47	38	24	13	45	41
20	29	29	47	50	36	26	42	46

Finalelement, un dernier test a été fait avec tous les paramètres conservés au fil des expériences soit : **1)** du pollen frais jeune, **2)** 150 g de sucrose, **3)** hydratation du pollen pendant 1 heure avant son utilisation, **4)** suspension de pollen (5 pincées / ml; 50 ?1 / milieu nutritif), **5)** pH du milieu de 5.8 et **6)** incubation du pollen sur milieu de culture pendant 22 heures, à la noirceur, dans un incubateur (tab. 9). Douze Pétri ont été examinés et le taux moyen de germination du pollen a été estimé à 45%.

Tableau 9. Détermination du pourcentage moyen de germination du pollen de fraisier avec tous les paramètres sélectionnés.

Sucrose (g)	% de germination du pollen / répétition											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
150	43	52	41	46	54	44	40	46	40	42	49	41

Conclusion de la première partie

Le milieu de culture doit contenir les ingrédients suivants, par litre de milieu : 15% de sucrose, 100 ppm d'acide borique, 300 ppm de nitrate de calcium, 200 ppm de sulfate de magnésium, 100 ppm de nitrate de potassium, 1.5% d'agar et le pH du milieu, avant l'ajout de l'agar, devrait être autour de 5,8. **2)** le pollen doit être frais et jeune (une journée après l'ouverture de la fleur) et il doit être appliqué sur un milieu de culture sous forme d'une suspension. **3)** le pollen doit être hydraté pendant 1 heure avant son utilisation. **4)** les milieux de cultureensemencés de pollen doivent être incubés à 24°C, à la noirceur, pendant 22 - 24 heures. **5)** Le pollen peut être conservé à 4°C, dans un dessiccateur. **6)** le taux moyen de germination est de 45%.

3.5 Essais avec les pesticides

3.5.1 Incorporation des fongicides au milieu de culture selon les concentrations recommandées au champ

La dose réelle employée au champ est trop forte lorsqu'elle est utilisée en laboratoire (tab. 10). Les conditions réelles observées au champ (température, pluie, vent, soleil, etc...) font en sorte que le

produit n'a peut-être pas un effet aussi drastique sur la fleur et le pollen que lorsqu'il est employé *in vitro*.

Tableau 10. Détermination du pourcentage de germination du pollen de fraisier lorsque traité avec des fongicides utilisés aux concentrations du champ.

Fongicide	% germination
Benlate	0
Captan 50W	0
Cuivre fixe	0
Ronilan	0
Rovral	0
Témoin	35

Les résultats sont guère plus encourageants lorsque la fleur est traitée directement avec le fongicide et transféré ensuite sur un milieu sans fongicide (tab. 11).

Tableau 11. Détermination du pourcentage de germination du pollen frais de fraisier déjà traité sur la fleur, au stade de l'anthèse, avec des fongicides utilisés aux concentrations du champ.

Fongicide	% germination après 2 heures	% germination après 4 heures
Benlate	1	4
Captan 50W	1	6
Témoin	15	20

3.5.2 Incorporation des fongicides au milieu de culture à des concentrations de 10, 100 et 1000 ppm

Le tube germinatif des grains de pollen du témoin est 7 à 12 x le diamètre des grains de pollen traités. À mesure que la concentration de fongicide augmente, les tubes germinatifs sont plus courts et souvent éclatés. À 1000 ppm, qui est l'équivalent de la dose recommandée au champ, il n'y a aucune germination.

Tableau 12. Détermination du pourcentage de germination du pollen de fraisier lorsque traité avec des fongicides aux concentrations de 10, 100 et 1000 ppm.

Fongicide	Répétition	Concentration (ppm)			
		10	100	1000	Témoin
Bénomyl	1	27	21	0	29
	2	27	29	0	20
	3	26	32	0	22
Rovral	1	58	32	0	29
	2	50	33	0	25
	3	42	34	0	39

3.5.3 Incorporation des fongicides au milieu de culture à la concentration de 10 ppm

Les tests de toxicité des fongicides envers le pollen de fraisier ont été faits à 10 ppm, pour tous les fongicides à l'étude. Les résultats obtenus (tab. 13) peuvent être divisés en trois groupes : **1)** Les fongicides toxiques : les captanes (Captan 50W, Captan 80W, Supra Captan 80 WDG et Maestro) inhibent la germination du pollen, comme rapporté dans la littérature. Le Folpan ne permet également aucune germination. **2)** Les fongicides présentant une certaine toxicité. Le Cuivre 53M, la chaux soufrée et l'Equal composent ce groupe. Dans ces cas, le taux de germination a varié entre 1 et 15%. **3)** Les fongicides compatibles avec le pollen de fraisier. Le Benlate (comme mentionné dans la littérature), le Rovral, Easout, le Ronilan et le Savon Safer's seraient parmi les meilleurs fongicides à employer à la floraison.

Quelques tests ont été refaits en serre, directement sur la fleur, avec les fongicides Benlate, Maestro, Folpan et Equal, afin de vérifier si à 10 ppm, les résultats seraient identiques à ceux obtenus *in vitro*. Contrairement au test précédent, les plants traités n'ont pas été recouverts d'un sac de plastique. Ils ont par contre été placés à la noirceur pendant 14 heures et le pollen a été récupéré 20 heures après le traitement. Malheureusement, lorsque le pollen traité a été transféré sur un milieu nutritif sans fongicide, le pollen a germé entre 33 et 48%.

Tableau 13. Détermination du pourcentage de germination du pollen de fraisier lorsque traité avec des fongicides aux concentrations de 10 ppm.

Fongicide	Milieu % germination	Témoin	Fleur % germination	Témoin
Benlate	35	48	48	33
Captan 50W	0	28	---	---
Captan 80W	0	51	---	---
SupraCaptan 80WDG	0	46	---	---
Cuivre 53M	15	39	---	---
Rovral	43	41	---	---
Bravo	0	48	---	---
Chaux soufrée	8	37	---	---
Easout	42	46	---	---
Ronilan	48	37	---	---
Maestro	0	41	39	40
Folpan	0	48	46	33
Savon Safer's	41	48	---	---
Equal	1	51	33	46

4. CONCLUSION

La mise au point du milieu de culture ne s'est pas faite sans heurt, considérant tous les paramètres qui influencent la germination du pollen. Néanmoins, le milieu de culture adapté permet d'avoir un taux moyen de germination se situant autour de 45%. Les pourcentages de germination maximale, obtenus avec d'autres espèces végétales, varient de 35 à 89%. La qualité du pollen est également un facteur très important. Il peut être frais ou réfrigéré mais il doit absolument être jeune i.e. prélevé une journée après l'ouverture de la fleur. L'hydratation du pollen, pendant une heure dans un environnement saturé (100% H.R.), est également un pré-requis. L'évaluation du pourcentage de germination est facilitée lorsque le pollen est mis en suspension avant d'être étalé sur le milieu. La germination se fait mieux à la noirceur, dans un incubateur (24°C), pendant 22 - 24 heures.

Les études de nocivité des fongicides envers le pollen de fraisier ont permis de classer les fongicides en trois groupes : **1)** Les fongicides toxiques : les captanes (Captan 50W, Captan 80W, Supra Captan 80 WDG et Maestro) et le Folpan. **2)** Les fongicides présentant une certaine toxicité. Le Cuivre 53M, la chaux soufrée et l'Equal composent ce groupe. **3)** Les fongicides compatibles avec le pollen de fraisier. Le Benlate, le Rovral, Easout, le Ronilan et le Savon Safer's seraient parmi les meilleurs fongicides à employer à la floraison.

L'utilisation des doses recommandées au champ, pour des tests effectués en laboratoire, n'a pas permis la germination du pollen. Les aléas climatiques observés au champ, qui ne peuvent être reproduits en serre ou en laboratoire, auraient un effet atténuant sur l'action des fongicides, les rendant moins toxiques pour le pollen, ce qui ne serait pas le cas lorsqu'ils sont employés, à pleine dose, dans un environnement contrôlé.

5. ACTIVITÉS DE DIFFUSION RÉALISÉES ET À VENIR

☞☞ Rencontre du **Groupe d'experts en protection des petits fruits** tenue au Lac Beauport, le 16 mars 2000 (Conférence donnée par M. Pierre O. Thibodeau, IRDA);

☞☞ À la «**Semaine Horticole 2001**», qui sera tenue à Saint-Hyacinthe, en février 2001;

☞☞ Bulletin d'information du **RAP - Petits Fruits**;

☞☞ **Rapport de recherche au PRAH.**

6. BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, J.D., B.D. Bruton and C.L. Patterson. 1991. Fungicidal Inhibition of Pollen Germination and Germ-tube Elongation in Muskmelon. *HortScience* 26(5):529-530.
- Abdul-Baki, A.A. 1992. Determination of Pollen Viability in Tomatoes. *J. Amer. Hort. Sci.* 117(3):473-476.
- Brewbaker, J.L. and B.H. Kwack. 1963. The Essential Role of Calcium Ion in Pollen Germination and Pollen Tube Growth. *Amer. Jour. Bot.* 50(9):859-865.
- Bristow, P.R. and A.Y. Shawa. 1981. The Influence of Fungicides on Pollen Germination and Yield of Cranberry. *J. Amer. Soc. Hort.* 106(3):290-292.
- Bronner, A. et R. Wagner. 1997. Pollen et floraison chez *Vitis vinifera* L. - Techniques de contrôle du pouvoir germinatif du pollen. *Le Progrès Agricole et Viticole.* pp.130-139.
- Church, R.M. and R.R. Williams. 1978. Fungicide Toxicity to Apple Pollen in the Anther. *J. Hort. Sci.* 53:91-94.
- Church, R.M. and R.R. Williams. 1977. The Toxicity to Apple Pollen of Several Fungicides, as Demonstrated by *in Vitro* and *in Vivo* Techniques. *J. Hort. Sci.* 52:429-436.
- Colas, F. et S. Mercier. 1994. Conservation à court terme et évaluation du taux de germination du pollen de bouleau gris et de bouleau à papier. MRN, Québec. Rapport interne no 378. 37 pp.
- Connor, K.F. and L.E. Towill. 1993. Pollen-Handling Protocol and Hydration/Dehydration Characteristics of Pollen for Application to Long-Term Storage. *Euphytica* 68:77-84.
- D'Antonio, V. and C.F. Quiros. 1987. Viability of Celery Pollen After Collection and Storage. *HortScience* 22(3):479-481.
- Eaton, G.W. 1961. Germination of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Pollen *In Vitro* as Influenced by Fungicides. *Can. J. Plant Sci.* 41:740-743.
- Guttridge, C.G. and J.M. Turnbull. 1975. Improving Anther Dehiscence and Pollen Germination in Strawberry with Boric Acid and Salts of Divalent Cations. *Hort. Res.* 14:73-79.
- Hecker, R.J. and M. McClintock. 1988. Sugar Beet Pollen Germination *in Vitro*. *J. of Sugar Beet Research* 25(1):42-54.
- Khanizadeh, S. and D. Buszard. 1987. Effects of the Fungicides Captan and Easout on Strawberry (*Fragaria x Anassa* Duch.) Fruit Development. *Advances in Strawberry Production.* pp. 27-31.
- MacFarlane, W.H., J.K. Jones and A.R. Sebastampillai. 1989. Pollen Storage of *Fragaria* and *Potentilla*. *Euphytica* 41:65-69.

- Mesquida, J., M. Renard et B. Mesquida. 1987. Étude préliminaire sur la germination *in vitro* du pollen de colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger) et sur l'évolution dans le temps de son aptitude à germer. *Agronomie* 7(6):409-416.
- Pesson, P. et J. Louveaux. 1984. Culture des petits fruits *dans* Pollinisation et productions végétales. pp. 373-392.
- Pfahler, P.L. 1966. *In Vitro* Germination and Pollen Tube Growth of Maize (*Zea Mays* L.) Pollen. *Can. J. Bot.* 45:839-845.
- Sato, S., N. Katoh, S. Iwai and M. Hagimori. 1998. Establishment of Reliable Methods of *in Vitro* Pollen Germination and Pollen Preservation of *Brassicae rapa* (syn. *B. campestris*). *Euphytica* 103:29-33.
- Shivanna, K.R. and J. Heslop-Harrison. 1980. Membrane State and Pollen Viability. *Ann. Bot.* 47:759-770.
- Shivanna, K.R. and N.S. Rangaswamy. 1992. *Pollen Biology - A Laboratory Manual*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Eds. 119 pp.
- Subbaiah, C.C. 1984. A Polyethylene Glycol Based Medium for *in Vitro* Germination of Cashew Pollen. *Can. J. Bot.* 62:2473-2475.
- Yates, I.E. and D. Sparks. 1989. Hydration and Temperature Influence *in Vitro* Germination of Pecan Pollen. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114(4):599-605.