

Développement du sac embryonnaire et aspects de la fécondation chez l'amandier autocompatible *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb cv. « Tuono »

Ahmed Oukabli^{a*}, Loudivi Dou-Elmakane Wallali^b, Ali Lansari^c, Abdelhadi Abousalim^b, José Egea^d

^a Inra,
3 esplanade du Dr. Giguët,
Meknès, Maroc

^b Iav Hassan II,
Rabat, Maroc

^c Ena,
Meknès, Maroc

^d Cebas, Csic,
Murcia, Espagne

Embryo sac development and fertilization aspects in the self-compatible almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb cv. "Tuono").

Abstract — Introduction. The optimization of fruit setting in almond is related to the success of pollination and fertilization. The reproductive phase, particularly the embryo sac development, and the fertilization aspects are important to know taking into account the recent acquisition of the self-compatibility character by this species. **Materials and methods.** Flowers of the self-compatible variety "Tuono" were manually pollinated and fixed at intervals of time varying from 1 to 20 d after pollination, then they were cut to a 3- μ m thickness for histological studies. **Results and discussion.** At the anthesis, the female gametophyte of the variety "Tuono" is at the four tetrad stage for 50% of the ovules observed in the embryo sac. The fusion of the polar nuclei was observed 5 d after pollination. Two weeks later, the sac contains a coenocytic framework in which the triploid nuclei of the endosperm multiply. The zygote, visible as of the second week after pollination, is located at the micropylar level. It developed in a pro-embryo 20 d after pollination.

Morocco / *Prunus dulcis* / fertilization / pollination / plant reproductive organs / embryonic development

Développement du sac embryonnaire et aspects de la fécondation chez l'amandier autocompatible *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb cv. « Tuono ».

Résumé — Introduction. L'optimisation de la fructification chez l'amandier est liée à la réussite de la pollinisation et de la fécondation. La phase reproductive, particulièrement le développement du sac embryonnaire, et les aspects de la fécondation sont importants à connaître compte tenu de l'acquisition récente du caractère d'autocompatibilité chez cette espèce. **Matériel et méthodes.** Des fleurs de la variété autocompatible « Tuono » ont été pollinisées manuellement et fixées à des intervalles de temps variant de 1 à 20 j après pollinisation, puis coupées à 3 μ m d'épaisseur pour une étude histologique. **Résultats et discussion.** À l'anthèse, le gamétophyte femelle de la variété « Tuono » est au stade quatre tétrades pour 50 % des ovules examinés dans le sac embryonnaire. La fusion des noyaux polaires a été observée 5 j après pollinisation. Deux semaines plus tard, le sac renferme une trame cœnocytique dans laquelle se multiplient les noyaux triploïdes de l'albumen. Le zygote, visible dès la deuxième semaine après pollinisation, est situé au niveau micropylaire. Il s'est développé en un pro-embryon 20 j après pollinisation.

Maroc / *Prunus dulcis* / fécondation / pollinisation / organe reproducteur végétal / développement embryonnaire

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 3 mars 2000
Accepté le 17 novembre 2000

Fruits, 2001, vol. 56, p. 93–99
© 2001 Cirad/EDP Sciences
All rights reserved

RESUMEN ESPAÑOL, p. 99

1. Introduction

Chez les rosacées fructifères à noyaux, l'ovaire renferme deux ovules de structure orthotrope [1–3]. Leur développement est un aspect important de la biologie florale au même titre que la pollinisation ou la croissance des tubes polliniques. Des études histologiques ont été réalisées sur plusieurs espèces végétales comme le cerisier [3–6], l'abricotier [7, 8], le prunier [9], le poirier [10], le litchi [11] et l'avocatier [12, 13]. Elles ont montré que l'avortement d'un certain nombre de sacs embryonnaires et/ou d'ovules handicape l'évolution florale et réduit les taux de fructification. Une bonne adéquation entre la maturité du sac embryonnaire et l'anthèse est nécessaire pour la réussite de la fécondation.

La fécondation, conduisant à la formation et au développement des graines et des fruits chez les rosacées à noyaux doit se produire dans un sac embryonnaire mature [3, 8, 10]. La durée de vie de ce dernier est défini dans le temps, il peut être un facteur limitant pour une bonne fructification. Le temps qui sépare la pollinisation de la fécondation est également un facteur dont dépend la production [14].

La notion de « qualité du bouton floral » tient compte aussi de la maturité du sac embryonnaire qui doit être complète au moment de l'anthèse ; or, un déphasage peut se produire. Chez le genre *Prunus*, un décalage de 2 à 7 jours entre les deux phénomènes a été noté [2, 3, 8, 10]. Outre la nature génétique du matériel végétal, le facteur « climat » a un impact considérable sur le développement du sac embryonnaire. Chez l'abricotier, des températures élevées avant la période de floraison hâtent sa maturité par rapport à l'anthèse, contrairement aux basses températures qui la retardent [8]. Chez l'amandier auto-incompatible, une semaine est nécessaire après l'anthèse pour que le gamétophyte femelle atteigne sa maturité. La présence de tubes polliniques compatibles dans le style stimule son développement en accélérant l'allongement de la cellule mère [2].

Les événements qui se produisent dans le sac embryonnaire, en relation avec la

fécondation, ont été décrits chez de nombreuses espèces végétales avec l'appui de la microscopie électronique à transmission [15, 16]. Chez l'amandier et d'autres espèces du genre *Prunus*, les connaissances acquises sur le processus de fécondation sont basées sur des observations en microscopie photonique de matériel végétal préparé de façon classique pour une étude histologique [2, 3, 8] ou observées directement en contraste de phase après éclaircissement des tissus [17]. Les aspects ultra-structuraux développés dans ces études concernent la description de la cellularisation du sac embryonnaire. Cependant les premiers événements de la fécondation, n'ont pas été décrits, en particulier chez l'amandier auto-compatible. Tel est l'objectif du présent travail.

2. Matériel et méthodes

Des fleurs d'amandier « Tuono », formées sous des conditions de températures moyennes comprises entre 8 et 15 °C, ont été émasculées au stade « bouton blanc » et auto-pollinisées manuellement selon la technique décrite par Kester et Asay [1]. Un échantillon de huit pistils a été prélevé 1, 5, 9, 10, 12, 15 et 20 j après pollinisation [18, 20].

Les fleurs ont été fixées dans une solution de F.A.A. (5 % de formol commercial, 90 % éthanol 50° et 5 % acide acétique pur). Les ovules ont été extraits de l'ovaire, fixés puis déshydratés. Les échantillons prélevés 1 à 12 j après pollinisation ont été inclus dans de la paraffine et sectionnés à 10 µm d'épaisseur. Les coupes ont été colorées selon la méthode de Gerlach [21] basée sur l'utilisation de la safranine à 3 %, du cristal violet et du vert lumière à 0,25 %. Les pistils prélevés 15 et 20 j après pollinisation ont été inclus dans la résine (glycolméthacrylate LKB 7100) et coupés au microtome LKB à 3 µm d'épaisseur. Les sections ont été préparées en pratiquant une double coloration consistant en une hydrolyse avec l'acide périodique à 1 % pendant 5 min puis une coloration de 15 min avec le réactif de

Schiff. Cette réaction colore les polysaccharides (parois et réserves amylacées) en rouge. Après lavage dans l'eau, les mêmes sections ont été mordancées par une solution d'alun de fer (2 %), puis colorées par l'hématoxyline d'Eidenhaim. Les noyaux, les nucléoles et le cytoplasme ont pris alors une teinte gris-brun plus ou moins foncée [22]. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope photonique Leica.

3. Résultats et discussion

3.1. Description histologique de l'ovule et du sac embryonnaire

L'examen des sections histologiques effectuées au niveau des ovaires montre que deux ovules se développent dans chaque ovaire. Chaque ovule renferme un sac embryonnaire situé du côté micropylaire. Le nucelle, délimité par le tégument, constitue sa masse principale. Les cellules du

nucelle poursuivent leur croissance et l'ovule augmente progressivement de taille. Le gamétophyte femelle est à un stade relativement avancé au moment de l'anthèse. Le sac embryonnaire est au stade quatre tétrades (*tableau I*) chez 50 % des ovules examinés. Il subit une évolution rapide durant les 5 j qui suivent la pollinisation, alors que les tubes polliniques arrivent à la base du style 4 j après pollinisation.

3.2. Organisation cellulaire du sac embryonnaire après pollinisation

Le sac embryonnaire renferme une oosphère (*figure 1*) souvent accompagnée d'une des deux synergides. Une des deux synergides pourrait dégénérer, ce qui, d'après Russell [23], favoriserait l'entrée du tube pollinique. La cellule centrale possède deux noyaux polaires qui migrent l'un vers l'autre pour fusionner (*figure 2*). Leur fusion, observée aux environs du centre du sac (*figure 2*), a lieu le cinquième jour après pollinisation. À ce stade, 20 % des ovules secondaires sont

Tableau I.

Pourcentage d'ovules primaires ov1 ou secondaires ov2 montrant certaines caractéristiques du développement de l'ovule et du sac embryonnaire au cours des 20 jours qui suivent la pollinisation chez l'amandier autocompatible *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb cv. « Tuono ».

Stade de l'ovule et du sac embryonnaire	Nombre de jours après fécondation										
	1	5		9		10		12		15	20
	ov1	ov1	ov2	ov1	ov2	ov1	ov2	ov1	ov2	ov1	ov1
Megasporocyte 4 tétrades	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sac embryonnaire à 4 noyaux	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0
Sac embryonnaire à 8 noyaux	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
Oosphère différenciée											
– noyaux polaires non fusionnés	0	80	40	0	0	0	50	0	20	100	50
– noyaux polaires fusionnés	0	20	40	75	75	100	25	100	0	0	0
Zygote	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0
Embryon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
Sac embryonnaire absent ou dégénéré	0	0	0	25	25	0	0	0	0	0	25
Albumen dégénéré	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,5
Ovule dégénéré ou absent	0	0	0	0	0	0	0	0	80	0	12,5
Nombre ovaires examinés	4		5		4		4		5	4	8

Figure 1.
Oosphère observée à partir d'une section longitudinale du sac embryonnaire (*Prunus dulcis* (Mill.) cv. « Tuono »).

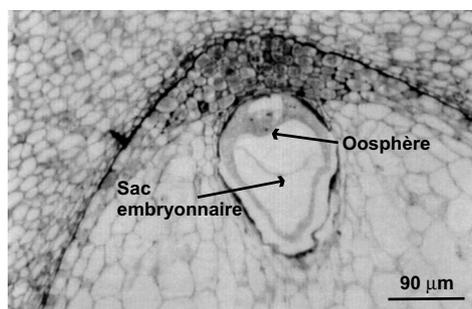
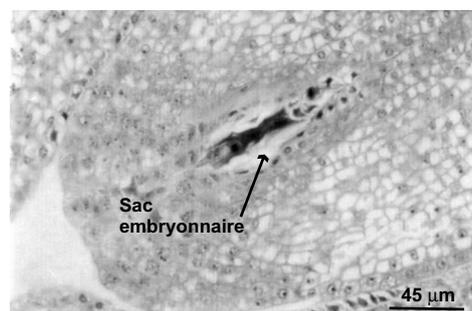


Figure 2.
Fusion des noyaux polaires (section longitudinale du sac embryonnaire, *Prunus dulcis* (Mill.) cv. « Tuono »).



dégénérés (*tableau I*). Cette dégénérescence est observée principalement après la fusion des noyaux polaires de l'ovule principal.

3.3. Allongement du sac embryonnaire

Le sac embryonnaire s'étend en direction de la chalaze aux dépens des cellules nucellaires. Son allongement est rapide entre le cinquième et le quinzième jour après pollinisation. Sa taille moyenne initiale, qui était de 57 µm cinq jours après pollinisation, est passée à 959 µm en moyenne 15 j après pollinisation, soit un accroissement moyen

journalier de 90,2 µm (*tableau II*). À ce stade, le sac embryonnaire a une longueur correspondant à 48 % de celle de l'ovule. Cet allongement accompagne les événements de la fécondation.

3.4. Événements de la fécondation

L'allongement du sac embryonnaire et la fusion des noyaux polaires marquent le début des événements de la fécondation (*tableau I*). Au niveau micropylaire, la désorganisation des cellules dépourvues de grains d'amidon témoigne du chemin d'entrée du tube pollinique. La décharge du contenu du tube pollinique et la migration des noyaux spermiques vers la cellule centrale et vers l'oosphère est présumée être rapide comme il a été rapporté chez d'autres angiospermes [23]. Après la fusion des noyaux polaires, c'est-à-dire au cours de la deuxième semaine après pollinisation, le sac embryonnaire renferme une trame cœnocytaire qui se développe progressivement (*figure 3*). C'est un syncytium dans lequel se multiplient les noyaux triploïdes de l'albumen (*figure 3*). Cette trame prend de l'importance du côté de l'oosphère et renferme des grains d'amidon qui deviennent de plus en plus abondants. Les noyaux de l'albumen se divisent et deviennent de plus en plus nombreux. Le zygote est observé au niveau du micropyle où les noyaux de l'albumen sont les plus nombreux. Il subit des divisions et, environ 20 j après pollinisation (*figure 4*), l'embryon globulaire est constitué de huit cellules (*tableau I*).

Tableau II.

Évolution au cours du temps de la longueur du sac embryonnaire et de l'ovule chez l'amandier autocompatible *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb cv. « Tuono » après auto-pollinisation.

Jours après pollinisation	Longueur du sac embryonnaire (µm)	Longueur de l'ovule (µm)	Rapport des longueurs [sac / ovule] (%)	Nombre d'ovules mesurés
5	57	1 095	5,2	5
10	410	1 550	26,5	5
15	959	2 004	47,8	4

3.5. Discussion

Le développement des deux ovules et le succès de la fécondation d'un certain nombre d'entre eux devraient avoir comme conséquence une production assez importante de fruits doubles. Les proportions d'amandes doubles sont en effet, sous ces conditions, de l'ordre de 12 %. La présence de deux ovules au niveau de l'ovaire de cette variété caractérise également d'autres rosacées à noyaux [3, 8, 24] mais, dans leur cas, un seul ovule se développe.

À l'anthèse, l'ovaire renferme un ovule en cours de développement puisque son sac embryonnaire est cellularisé (présence de huit cellules) dès le cinquième jour. La différenciation du gamétophyte femelle débute donc avant l'anthèse. La fusion des noyaux polaires observée également dès le cinquième jour montre que le sac embryonnaire est à un stade de maturité plus avancé que celui rapporté par Pimienta et Polito [2] chez la variété d'amandier auto-incompatible « Nonpareil ». Dans ce cas, après ouverture florale, une semaine est nécessaire pour que le sac embryonnaire devienne mature. Ce retard dans le développement du gamétophyte femelle a été observé également chez d'autres espèces du genre *Prunus* comme le pêcher [18], l'abricotier [24, 25] et le cerisier [3]. La nature génétique du matériel végétal et les conditions d'expérimentation seraient à l'origine de cette différence.

L'auto-pollinisation stimule le développement et la maturation du sac embryonnaire de l'amandier Tuono. L'influence positive des pollinisations compatibles sur le développement du sac embryonnaire a été rapportée chez plusieurs espèces fruitières [18, 25, 26, 28]. La nature du stimulus pourrait être soit un facteur de croissance provenant directement des tubes polliniques, soit un produit des cellules sénescents du tissu styloïde qui ont supporté le passage des tubes polliniques [2, 18, 29].

Les tubes polliniques arrivent à la base du style 4 j après pollinisation et la fécondation (présence du zygote ou de l'embryon) ne s'observe qu'une semaine plus tard. Un arrêt de 8 j est donc nécessaire

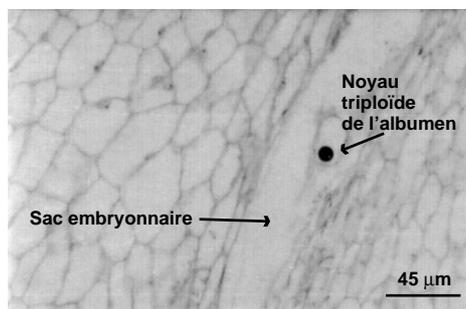


Figure 3. Noyau triploïde observé à partir d'une section longitudinale du sac embryonnaire (*Prunus dulcis* (Mill.) cv. « Tuono »).

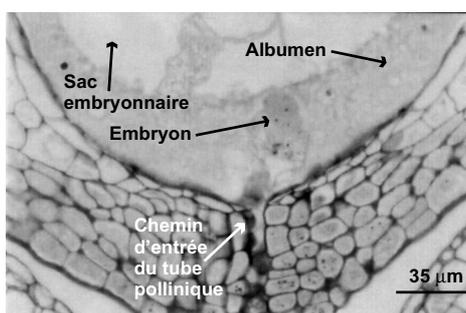


Figure 4. Chemin d'entrée du tube pollinique visible à partir d'une section longitudinale du sac embryonnaire. L'embryon est situé au sein d'une trame cœnocytique formant l'albumen (*Prunus dulcis* (Mill.) cv. « Tuono »).

pour la fusion complète des gamètes. Une telle durée entre la pollinisation et la fécondation a été rapportée également chez d'autres angiospermes [11, 18, 28, 30]. Elle pourrait s'expliquer par la nécessité de la mise en place de certains changements liés à la maturation de l'ovule pour que la fécondation puisse avoir lieu. Ce délai, observé aussi chez le pêcher, autre espèce auto-compatible, a été expliqué, dans ce cas, par un manque de ressources nécessaires à la croissance lorsque les tubes polliniques atteignent l'obturateur [27]. Leur entrée est contrôlée par un stimulus chimiotropique produit par l'ovule [26].

La présence de grains d'amidon autour du zygote et dans la cellule œuf marque le début d'une intense activité métabolique pendant la fécondation. La mise en place de l'albumen et de l'embryon est observable à partir de la deuxième semaine après la pollinisation (tableau 1), 12,5 % d'ovules auto-pollinisés présentent un albumen dégénéré. Cette dégénérescence pourrait avoir comme origine des facteurs nutritifs ou génétiques. En présence d'un grand nombre de fleurs fécondées sur l'arbre, l'avortement embryonnaire ou de l'albumen

est un mécanisme qui semble réguler la charge à porter en fonction des ressources disponibles. Parmi les facteurs génétiques, l'expression de gènes délétères ou létaux homozygotes, favorisés par l'autofécondation, peut conduire également à cet avortement comme il a été rapporté par Krebs et Hancock [1] chez la myrtille. L'avortement post-zygotique est rattaché aux effets dépressifs de l'«inbreeding». Ce phénomène peut se manifester, de manière différente, à différents stades de la plante comme à la nouaison, la germination ou lors de la croissance des semis.

Note

Ce travail a été réalisé grâce à la contribution financière du Ciheam (Espagne) et de l'Inra (France).

Références

- [1] Kester D.E., Asay R., Almond, in: Janick J., Moore J.V. (Eds), *Advances in fruit breeding*, 1975, pp. 387–420.
- [2] Pimienta E., Polito V.S., Embryo sac development in almond (*Prunus dulcis* (Mill.), D.A. Webb), *Ann. Bot.* 51 (1983) 469–479.
- [3] Furukawa Y., Bukovac M., Embryo sac development in sour cherry during the pollination period as related to fruit set, *HorstScience* 24 (6) (1989) 1005–1008.
- [4] Eaton G.W., A study of the megagametophyte in *Prunus avium* and its relation to fruit setting, *Can. J. Plant Sci.* 39 (1959) 466–476.
- [5] Stösser R., Avrani V.P., On the senescence of ovules in cherries, *Sci. Hortic.* 16 (1982) 29–30.
- [6] Tonutti P., Ramina A., Cossio F., Bargioni G., Effective pollination period and ovule longevity in *Prunus avium* L., *Adv. Hortic. Sci.* 5 (1991) 157–162.
- [7] Burgos L., Egea J., Apricot embryo-sac development in relation to fruit set, *J. Hortic. Sci.* 68 (2) (1993) 203–208.
- [8] Egea J., Burgos L., Year-to-year variation in the developmental stage of the embryo sac at anthesis in flowers of apricot (*Prunus armeniaca* L.), *J. Hortic. Sci.* 69 (1994) 318–322.
- [9] Forino L.M.C., Tagliasecchi A.M., Avanzi S., Embryo-sacs frequency in ovules of abscission affected fruits in *Malus domestica* Borkh., *Adv. Hortic. Sci.* 1 (1987) 65–67.
- [10] Herrero M., Factors affecting fruit set in 'Agua de Aranjuez' pear, *Acta Hortic.* 139 (1983) 91–96.
- [11] Stern R.A., Eisenstein D., Voet H., Gazit S., Anatomical structure of two day old litchi ovules in relation to fruit set and yield, *J. Hortic. Sci.* 71 (4) (1996) 661–671.
- [12] Tomer E., Gottreich M., Defective ovules in avocado cultivars, *J. Am. Soc. Sci.* 101 (5) (1976) 620–623.
- [13] Sedgley M., Light microscope study of pollen tube growth, fertilisation and early embryo and endosperm development in the avocado varieties 'Fuerte' and 'Hass', *Ann. Bot.* 44 (1977) 359–363.
- [14] Williams R.R., Wilson D., Towards regulated cropping, Eds Long Ashton Res. Sta. Univ. Bristol, Grower Books, London, 1970.
- [15] Lloyd Mogensen H., Fine structure and composition of the egg apparatus before and after fertilization in *Quercus gambelii*: the functional ovule, *Am. J. Bot.* 59 (9) (1972) 931–941.
- [16] Janson J., Willemsse M.T.M., Pollen tube penetration and fertilization in *Lilium longiflorum* (Liliaceae), *Am. J. Bot.* 82 (2) (1995) 186–196.
- [17] Rubio-Cabetas M.J., Socias I Company R., Fertilisation assessment and postzygotic development in several intra- and interspecific *Prunus* hybrids, *Euphytica* 90 (1996) 325–330.
- [18] Herrero M., Arancha A., Influence of pistil of pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*), *Am. J. Bot.* 76 (10) (1989) 1441–1447.
- [19] Burgos L., Egea J., Dicenta F., Effective pollination period in apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties, *Ann. Appl. Biol.* 119 (1991) 533–539.
- [20] Socias I Company R., Felipé A.J., Self-compatibility and autogamy in 'Guara' almond, *J. Hortic. Sci.* 37 (3) (1992) 313–317.
- [21] Gerlach D., A rapid safranin crystal violet light green staining sequence for paraffin sections of plant materials, *Stain Tech.* 44 (1969) 210–211.
- [22] Bancraft D., Stevens A., Rurner D.R., Theory and practice of histological techniques, 3rd edition, Churchill Livingstone Edinburgh, London Lelbourne and New-York, 1990.

- [23] Russell S.D., Fertilization in *Plumbago zeylanica*: entry and discharge of the pollen tube in the embryo sac, *Can. J. Bot.* 60 (1982) 2219–2230.
- [24] Egea J., Burgos L., Supernumerary ovules in flowers of apricot, *Acta Hortic.* 384 (1995) 373–376.
- [25] Egea J., Burgos L., Fructification problems in continental apricot cultivars growing under Mediterranean climate. Ovule development at anthesis in two climatic areas, *J. Hortic. Sci. Biotech.* 73 (1) (1998) 107–110.
- [26] Herrero M., Gascon M., Prolongation of embryo sac viability in pear (*Pyrus communis*) following pollination or treatment with gibberellic acid, *Ann. Bot.* 60 (1987) 287–294.
- [27] Arbeloa A., Herrero M., The significance of the obturator in the control of pollen tube entry into the ovary in peach (*Prunus persica*), *Ann. Bot.* 60 (1987) 681–685.
- [28] Shuraky Y.D., Sedgley M., Pollen tube pathway and stimulation of embryo sac development in *Pistacia vera* (Anacardiaceae), *Ann. Bot.* 79 (1997) 361–369.
- [29] Sims T.L., Genetic regulation of self-auto-compatibility, *Crit. Rev. Plant Sci.* 12 (1–2) (1993) 129–167.
- [30] Eaton G.W., Jamont A.M., Embryo sac development in the apricot, *Prunus armeniaca* L. cv. 'Constant', *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 86 (1965) 95–101.
- [31] Krebs S.L., Hancock J.F., Early-acting inbreeding depression and reproductive success in the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum* L., *Theor. Appl. Genet.* 79 (1990) 825–832.

Desarrollo del saco embrionario y aspectos de la fecundación en el almendro autocompatible *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb cv. "Tuono".

Resumen — Introducción. La optimización de la fructificación en el almendro está ligada al éxito de la polinización y fecundación. Es importante conocer la fase reproductiva, especialmente el desarrollo del saco embrionario, y los aspectos de la fecundación debido a la adquisición reciente del carácter de autocompatibilidad en esta especie. **Material y métodos.** Se polinizaron manualmente flores de la variedad autocompatible "Tuono" y se fijaron a intervalos de tiempo que iban de 1 a 20 d luego de la polinización, se cortaban después con un grosor de 3 µm para su estudio histológico. **Resultados y discusión.** En la antesis, el gametofito femenino de la variedad "Tuono" está en la fase cuatro tétrades en el 50% de los óvulos examinados en el saco embrionario. Se observó la fusión de los núcleos polares 5 d después de la polinización. Dos semanas más tarde, el saco contiene una trama cenocítica en la que se multiplican los núcleos triploides del albumen. El cigoto, visible desde la segunda semana después de la polinización, está en el nivel micropilar. Se desarrolló un proembrión 20 d después de la polinización.

Marruecos / *Prunus dulcis* / fecundación / polinización / órganos reproductores vegetales / desarrollo embrionario