

# Qualité reproductrice du pollen présenté par la plante

## 1. Introduction

La qualité de l'interaction pollen-abeille dont dépend la formation de graines fonctionnelles, est contrôlée en premier lieu par la qualité reproductrice du pollen lorsqu'il est présenté par la plante. Or, il a été montré chez plusieurs espèces que le pollen n'avait pas une qualité reproductrice maximale à l'anthèse (Nepi *et al.*, 2001 ; Erickson and Markhart, 2002). Par exemple, la viabilité du pollen de *Leymus chinensis* n'est au moment de la déhiscence que de 71% (Huang *et al.*, 2004). De plus, la viabilité de grains de pollen collectés à différents moments de la journée peut varier (Stanley and Linskens, 1974). Il a été montré que celle de *Cucurbita pepo* est de 92% à la déhiscence, alors qu'elle n'est plus que de 75% six heures après (Nepi and Pacini, 1993). Cependant, la longévité du pollen varie fortement en fonction des espèces. Alors que le pollen de certaines Liliacées et Rosacées peut rester viable pendant 100 jours (Leduc *et al.*, 1990), la viabilité du pollen d'*Erythronium* décroît significativement en une heure d'exposition à l'air après déhiscence (Kearns et Inouye, 1993).

Qu'en est-il du pollen de *C. melo* dont l'anthèse ne dure qu'une journée ? Quelle est la qualité reproductrice du pollen présenté par la plante et comment évolue-t-elle au cours de l'anthèse ? Pour répondre à ces interrogations, un suivi de la viabilité et de l'aptitude à germer du pollen de *C. melo* a été réalisé tout au long de l'anthèse.

Le but de cette étude était de déterminer s'il existait une période durant laquelle le pollen possédait une qualité reproductrice optimale qui augmenterait l'efficacité de l'interaction pollen-abeille.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériel végétal

Cette étude a été menée en 2007, 2008 et 2009 avec du melon (*C. melo* L. var. *cantalupensis*) var. Thorgal® (Nunhems) cultivé sur sol paillé. Le dispositif expérimental était composé de 64 plantes réparties sur trois rangs en 2007 et quatre rangs en 2008 et 2009 espacés de 0,90 m. La distance inter-plante dans chaque rang était de 0,85 m. Différentes conditions de culture ont été utilisées en fonction des années. En 2007, la culture a été mise en place en plein champ (mode de culture préconisé pour cette variété ; Figure 25). L'irrigation était d'une

heure trois fois par semaine. La culture était protégée de façon conventionnelle, par lutte chimique.



**Figure 35 : Culture en plein champ de *C. melo*.**

En 2008, la culture a été menée sous tunnel insect-proof (filet limitant grandement le passage d'arthropodes) pour éviter la pollinisation par les insectes (Figure 36). L'irrigation était, comme l'année précédente, d'une heure trois fois par semaine. En revanche, la protection de la culture a été faite par lutte intégrée.

Les mêmes conditions culturales ont été utilisées en 2009, exceptée l'irrigation qui était de 7 minutes trois fois par jour (à 4h, 12h et 20h).



Figure 36 : Culture de *C. melo* sous tunnel insect-proof.

Notre travail étant à l'échelle d'une population et non de la plante, la culture a été découpée en 64 zones géographiques (Figure 37). Le melon ayant une croissance avec des tiges rampantes en lianes, chaque rang devient rapidement un enchevêtrement de tiges appartenant à des plantes différentes. Chaque zone contient des tiges de différentes plantes. Les fleurs présentes sur une zone provenaient donc de différentes plantes.

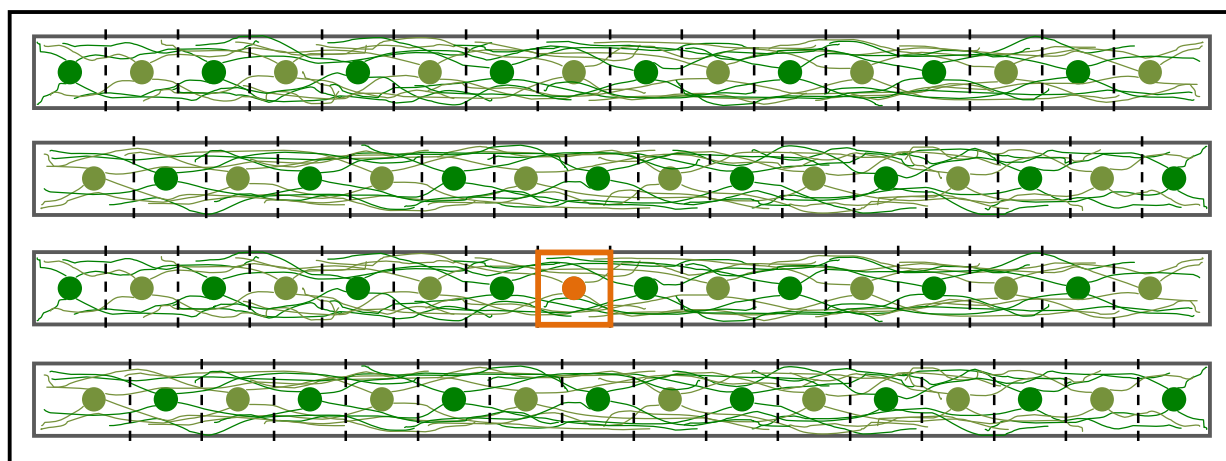


Figure 37 : Schéma de la culture divisée en 64 zones. Chaque zone est centrée sur le pied d'une plante (● et ●) et couvre la largeur du rang depuis la moitié de la distance entre son centre et le pied précédent (|) jusqu'à la moitié de la distance entre son centre et le pied suivant. Elle contient des tiges de différentes plantes (~~~~). Exemple d'une zone (□) et de son centre (●).



## 2.2.Récolte des fleurs

Cette étude de la viabilité du pollen a été réalisée durant la période d'anthèse. L'heure de début d'anthèse a été fixée à 8h (heure d'été) sur la base des observations de Rosa (1924) et McGregor et Todd (1952). La période d'anthèse a été étudiée selon un pas de temps de trois heures, depuis 3 heures avant anthèse (en 2008 et 2009 uniquement), jusqu'à 9 heures après anthèse, soit 5h, 8h, 11h, 14h et 17h (heure d'été).

Pour chaque temps d'étude, les fleurs mâles ont été choisies la veille de l'expérimentation, par tirage aléatoire des zones de prélèvement réalisé avec logiciel R. Dans chacune de ces zones, un bouton floral au stade un jour avant anthèse a été choisi. Pour cela, il devait être fermé, mais présenter des pétales jaunes. Ces boutons ont été identifiés avec une étiquette portant le temps d'étude et le numéro de fleur (Figure 38). Dans le cas de la culture en plein-champ (2007), ces boutons ont été ensachés avec un sac en tulle pour éviter que des pollinisateurs ne prélèvent leur pollen lors de la période d'anthèse (Figure 39).



**Figure 38 : Fleurs prélevées aux différents temps d'étude de la journée d'anthèse.** Fleurs choisies et étiquetées la veille de l'expérimentation et prélevées à 5h (A), 8h (B), 11h (C), 14h (D) et 17h (E).



**Figure 39 : Fleur choisie et étiquetée la veille de son anthèse et ensachée afin de la protéger d'éventuels pollinisateurs.**

Le jour de l'expérimentation, les fleurs d'un temps d'étude ont été récoltées. En 2007, trois répétitions ont été réalisées. Pour chacune d'entre elles, 12 fleurs par temps ont été étudiées. En 2008, deux répétitions ont été réalisées, avec 12 et 24 fleurs analysées par temps lors de la

lère et de la 2<sup>nde</sup> répétition respectivement. Une seule journée d'anthèse a été étudiée en 2009, avec 30 fleurs analysées par temps et par composante de la qualité à évaluer.

### **2.3.Evaluation de la viabilité par FCR**

Les anthères de chaque fleur constituaient une US. Elles ont été excisées puis placées dans un tube contenant 1 ml de solution réactionnelle, composée soit de saccharose à 15% (p/v), soit de saccharose à 15% (p/v) et d'acide borique à 5 mg.l<sup>-1</sup>. A chaque tube ont été rajoutés 2,5 µl de diacétate de fluorescéine à 2 mg/ml dans de l'acétone.

Après 15 minutes de réaction, 20 µl de mélange réactionnel contenant le pollen ont été prélevés et déposés sur une lame de microscope puis recouverts d'une lamelle. Les lames ont ensuite été observées sous microscope à épifluorescence. Un total de 100 grains de pollen par lames ont été analysés et notés viables ou non viables.

### **2.4.Evaluation de l'aptitude à germer**

Les anthères de chaque fleur constituaient une US. Elles ont été excisées puis placées dans un tube contenant 500 µl de milieu germinatif composé de saccharose à 20% (p/v) et d'acide borique à 5 mg.l<sup>-1</sup>. Après deux heures d'incubation à 32°C, 2 gouttes de carmin acétique à 5% ont été rajoutées dans chaque tube. Après 10 min de coloration, 20 µl de solution ont été prélevés et montés entre lame et lamelle. Cent grains de pollen ont été analysés par lame et notés germés ou non germés.

### **2.5.Données climatiques**

Les données climatiques des journées d'expérimentation ont été fournies par l'unité Agroclim de l'INRA d'Avignon.

### **2.6.Analyse statistique**

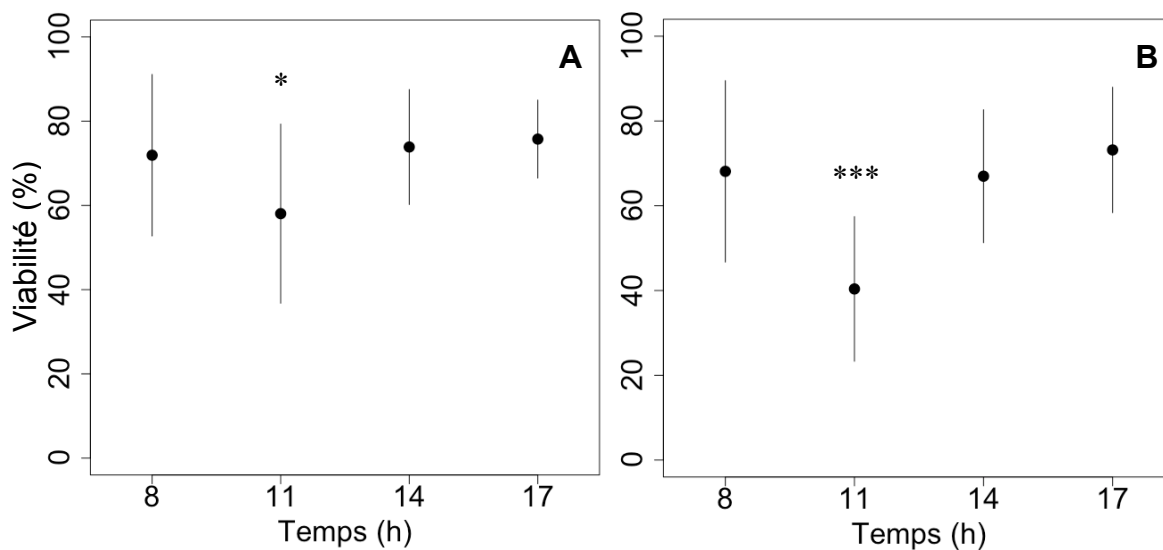
Les proportions de pollen viable ou germé ont été transformées par la fonction arc sinus (Sokal and Rohlf, 1994). Cependant, même après transformation, elles ne remplissaient pas la condition de normalité (test Shapiro,  $p=7,6.10^{-8}$ ). Les données ont alors été traitées en utilisant un modèle linéaire généralisé (GLM) qui permet de prendre en compte le fait que les

conditions de normalité ne soient pas respectées (Faraway, 2005). Dans ce GLM, une distribution des données de type binomiale a été spécifiée (par exemple, pollen viable vs pollen non viable). Les données présentaient une tendance à la surdispersion. De ce fait, la famille « quasi-binomiale » a été privilégiée afin de pouvoir réaliser des comparaisons de modèles par un test de déletion (likelihood-ratio test) avec la fonction ANOVA (Library stats, R Core Team). En outre, la contribution respective des variables introduites dans un modèle a été estimée par le test de Wald. Ce dernier utilise la valeur t de Student pour évaluer si les coefficients associés aux variables sont significativement différents de 0. Un seuil de signification  $\alpha=0,05$  a été utilisé et ces tests ont été réalisés avec le logiciel R.

### **3.Résultats**

Durant les trois années d'expérimentations, certains paramètres expérimentaux ont été changés, notamment la méthode d'estimation de la viabilité. Nous avons comparé les valeurs de viabilité à 5h (3 heures avant anthèse) obtenues en 2008 (92,9% ; méthode normale) et en 2009 (92,4% ; ajout d'acide borique). Ce temps a été choisi pour s'affranchir de l'effet de l'environnement sur la viabilité du pollen car la déhiscence n'a pas encore eu lieu. Ainsi cette comparaison nous a permis de vérifier que ce changement de méthode n'avait pas d'effet sur l'estimation de la viabilité (ANOVA,  $F_{1,63}=0,25$ ,  $p=0,62$ ).

Le suivi de la viabilité du pollen de *C. melo* durant la journée d'anthèse en 2007 a montré qu'à l'anthèse, environ 72% des grains de pollen étaient viables (Figure 40A).

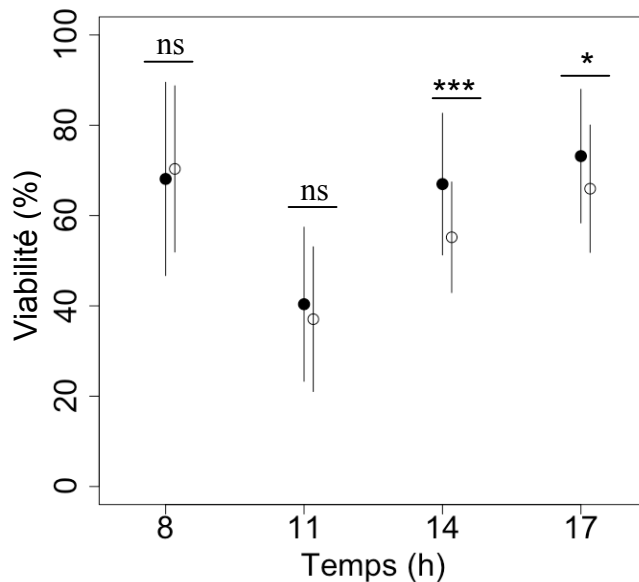


**Figure 40 : Viabilité du pollen de *C. melo* durant la journée d'anthèse.** Suivis réalisés en 2007 (A) et en 2008 (B). Les barres représentent l'écart-type, n=36, \* = différence significative à  $p < 0,05$ , \*\*\* = différence significative à  $p < 0,001$ .

La viabilité a ensuite diminué de plus de 13% à 11h (soit 3 heures après l'anthèse) avant d'augmenter, d'une manière inattendue, jusqu'à 75,7% à 17h. La même tendance a été observée en 2008, bien que la chute de viabilité à 11h soit encore plus importante (près de 28% ; Figure 40B). L'analyse de variance a montré qu'il n'y avait pas d'interaction significative entre le temps et l'année, c'est-à-dire, que le pattern temporel reste inchangé durant ces deux années (ANOVA,  $F_{1, 276}=0,15$ ,  $p=0,70$ ), bien que le temps et l'année aient des effets significatifs ( $F_{1, 277}=12,53$ ,  $p=4,7 \cdot 10^{-3}$  ;  $F_{1, 277}=15,20$ ,  $p=1,2 \cdot 10^{-3}$  respectivement). L'effet année ne peut pas s'expliquer par des changements climatiques car la température (test de Wald,  $t=1,48$ ,  $p=0,15$ ) et l'humidité relative (test de Wald,  $t=-0,31$ ,  $p=0,75$ ) ne diffèrent pas significativement.

A cause des variations « réversibles » de la viabilité au cours du temps, ce facteur ne peut pas être considéré en tant que variable continue, mais en tant que catégorie. L'effet année étant fort, chaque année a été analysée séparément. Il en ressort que pour les deux années, la viabilité du pollen enregistrée à 11h est significativement plus faible qu'aux autres temps (test de Wald, pour 2007 :  $t=-2,60$ ,  $p=0,01$  ; pour 2008 :  $t=-6,21$ ,  $p=5,85 \cdot 10^{-9}$ ).

La viabilité n'étant pas, normalement, une propriété réversible, nous avons émis l'hypothèse que le pollen non viable se déshydratât et perdait son adhérence. De ce fait, il ne resterait pas aggloméré dans l'anthère, mais se retrouverait piégé par les trichomes des pétales et ne serait donc plus enregistré comme non viable à 14h. Pour tester cette hypothèse, les estimations de viabilité ont été réalisées en prélevant les anthères et la portion de pièces florales les entourant (Figure 41).



**Figure 41 : Effet de la localisation du pollen sur sa viabilité au cours de l'anthèse.** Viabilité moyenne du pollen présent dans les anthères (●) et dans les anthères et les pièces florales (○), n=36. Les barres représentent l'écart-type, ns = différence non significative, \* = différence significative à  $p < 0,05$ , \*\*\* = différence significative à  $p < 0,001$ .

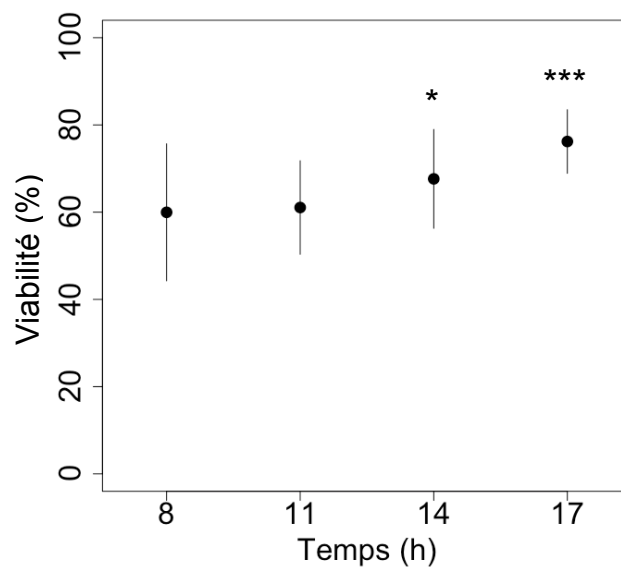
La viabilité du pollen est significativement plus faible à 14h et à 17h lorsque le pollen provient des anthères et des pièces florales que lorsqu'il provient uniquement des anthères (ANOVA,  $F_{1, 70} = 12,24$ ,  $p = 0,0008$  pour 14h ;  $F_{1, 70} = 4,43$ ,  $p = 0,038$  pour 17h). Cependant, même dans ce cas, la viabilité du pollen redevient plus élevée après 11h. Cette hypothèse ne permet donc pas d'expliquer la chute de viabilité à 11h.

La FCR est une méthode connue pour être sensible au niveau d'hydratation du pollen. Il se pourrait alors que les variations quotidiennes d'humidité relative affectent la viabilité du pollen. Pour vérifier cette hypothèse deux analyses ont été envisagées : (i) analyse statistique en incluant l'humidité relative dans le modèle linéaire généralisé et en vérifiant si elle augmente la proportion de déviance expliquée et (ii) analyse expérimentale en testant l'effet d'une augmentation de la fréquence d'irrigation sur la viabilité.



Pour l'analyse statistique, il a fallu dans un premier temps calculer les résidus de la relation humidité relative/temps pour fixer la corrélation entre ces deux facteurs car l'humidité relative est dépendante du temps. Nos résultats montrent que celle-ci a un effet positif sur la viabilité du pollen (ANOVA,  $F_{1,275}=4,37$ ,  $p=0,037$ ).

Après avoir vérifié statistiquement que l'humidité relative influençait la viabilité du pollen, nous avons testé expérimentalement l'effet d'un changement de conduite d'irrigation. La parcelle, irriguée précédemment 1 heure 3 fois par semaine, a été irriguée 7 minutes 3 fois par jour. Ce changement de conduite a entraîné une variation de la viabilité du pollen (Figure 42).

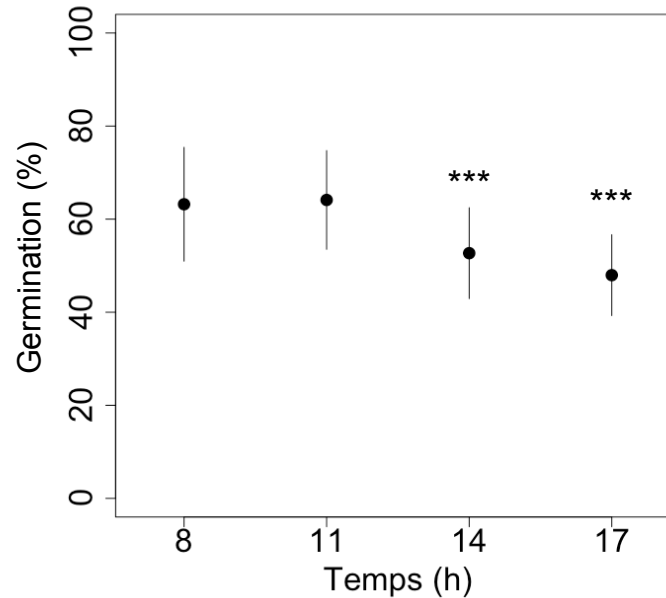


**Figure 42 : Suivi de la viabilité du pollen de *C. melo* durant la journée d'anthèse effectué en 2009.** Chaque point représente la viabilité moyenne du pollen mesurée sur 30 fleurs. Les barres représentent l'écart-type, \* = différence significative à  $p<0,05$ , \*\*\* = différence significative à  $p<0,001$ .

La viabilité enregistrée à l'anthèse est plus faible que les années précédentes (60% en 2009 contre 70% en 2008). Cependant, le changement d'irrigation a permis d'obtenir une viabilité du pollen qui ne diminuait pas à 11h (test de Wald,  $t=0,36$ ,  $p=0,72$ ). En revanche, la viabilité à 14h et à 17h est significativement plus élevée qu'à 8h et 11h ( $t=2,52$ ,  $p=0,01$  et  $t=5,46$ ,  $p=2,69.10^{-7}$  respectivement), jusqu'à atteindre 76% à 17h.

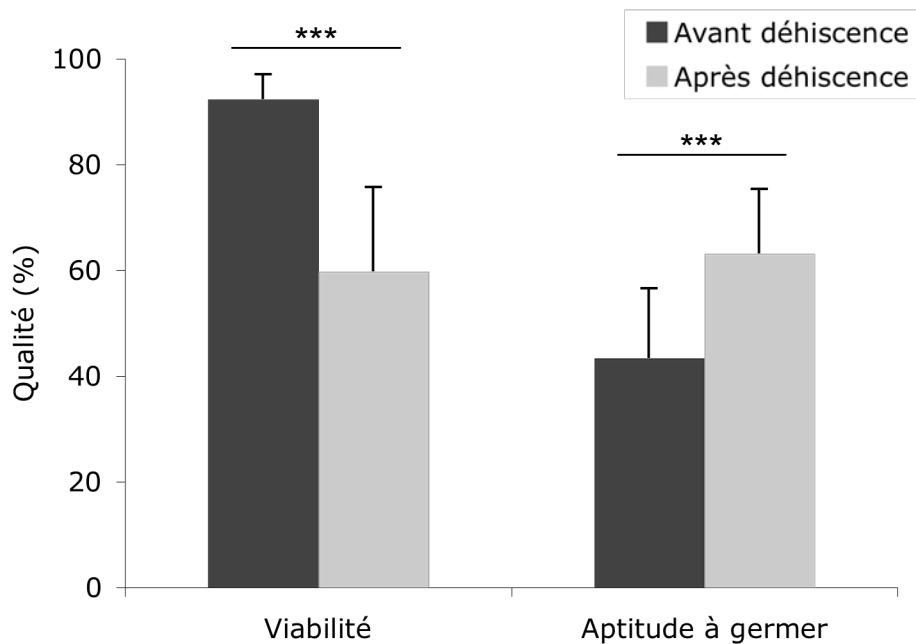
En comparant les valeurs de viabilité enregistrées avec deux fréquences d'irrigation différentes (trihebdomadaire en 2008 et quotidienne en 2009), il ressort que la fréquence d'irrigation influence significativement la variation de viabilité au cours de la journée d'anthèse (interaction temps/conduite, ANOVA,  $F_{3,255}=9,29$ ,  $p=7,47.10^{-6}$ ). En considérant les variations de viabilité heure par heure, on s'aperçoit que l'effet du mode d'irrigation est significatif uniquement à 11h.

L'aptitude à germer *in vitro* a été estimée en 2009 (Figure 43). Celle-ci est en moyenne de 63% à l'anthèse. Elle est stable pendant les trois premières heures (test de Wald,  $t=0,35$ ,  $p=0,73$ ) puis diminue pour atteindre 48% en fin de journée ( $t=-5,55$ ,  $p=1,86.10^{-7}$ ).



**Figure 43 : Aptitude à germer du pollen de *C. melo* au cours de la journée d'anthèse.** Chaque point représente l'aptitude à germer moyenne du pollen mesurée sur 30 fleurs. Les barres représentent l'écart-type, \*\*\* = différence significative à  $p < 0,001$ .

La qualité reproductrice du pollen de *C. melo* n'a pas été uniquement suivie au cours de la journée d'anthèse. Nous nous sommes également intéressés à sa variation due à l'exposition au milieu environnant. Autrement dit, la qualité du pollen a été évaluée avant et après ouverture des anthères (Figure 44). Nos résultats ont montré qu'avant anthèse (à 5h), le pollen possède une viabilité moyenne de plus de 92% alors que celle-ci n'est plus que d'environ 60% à l'anthèse. L'exposition aux conditions environnementales a donc entraîné une diminution de plus de 30% de la viabilité (test de Wald,  $t=-10,12$  ;  $p=2,47.10^{-14}$ ). Quant à l'aptitude à germer, elle est d'environ 44% avant anthèse alors qu'elle est d'environ 63% à l'anthèse. Il y a donc une augmentation de l'aptitude à germer de 20% juste avant anthèse ( $t=-5,76$ ,  $p=3,38.10^{-7}$ ).



**Figure 44 : Variation de la qualité reproductrice du pollen de *C. melo* lors de son exposition au milieu environnant.** Chaque histogramme représente la qualité moyenne du pollen mesurée sur 30 fleurs. Les barres représentent l'écart-type, \*\*\* = différence significative à  $p < 0,001$ .

#### **4. Discussion**

Avant anthèse, 92% des grains de pollen sont viables. La proportion de grains non viables enregistrée peut correspondre à la production de grains vides comme cela a été montré dans le chapitre précédent. Bien que la proportion de grains vides évaluée était plus faible, il est à noter qu'elle avait été mesurée chez des boutons floraux plus jeunes que les fleurs analysées ici. Il est donc possible que des dégénérescences cellulaires supplémentaires aient eu lieu entre le dernier stade que nous avons étudié et 3 heures avant anthèse. La déhiscence, c'est-à-dire la mise en contact avec le milieu environnant, induit une perte de près de 25% de la viabilité. Il est en effet connu que les stress environnementaux affectent la viabilité du pollen (Dafni and Firmage, 2000). Nos résultats ont montré que la viabilité du pollen de *C. melo* était de 70% à l'anthèse comme chez *Leymus chinensis* (Huang *et al.*, 2004) alors qu'elle est de 92% chez *Cucurbita pepo* (Nepi and Pacini, 1993). La viabilité du pollen de *C. melo* ne décroît pas au cours des heures qui suivent l'anthèse. Ainsi, 6 heures et 9 heures après anthèse, la proportion de grains de pollen viables était similaire que celle enregistrée à l'anthèse. Ce résultat est inattendu car le pollen de *C. melo* est du type partiellement hydraté

(Franchi *et al.*, 2002). Il devrait supposément avoir une longévité réduite (Nepi *et al.*, 2001 ; Franchi *et al.*, 2002), comme le pollen de *Cucurbita pepo*, dont la viabilité diminue de 15% 6 heures après anthèse et n'est plus que de 20% 11 heures après l'anthèse (Nepi and Pacini, 1993). Cependant, dans nos conditions d'expérimentation, la dernière mesure de viabilité n'est pas faite à la fin de l'anthèse. En effet, les fleurs prélevées à 17h et servant à l'analyse n'étaient pas fanées. Il serait intéressant de connaître la viabilité du pollen à la fin de la journée d'anthèse en faisant une mesure supplémentaire à 20h. Néanmoins, nous avons choisi de réaliser un suivi de la qualité du pollen jusqu'à 17h car ce travail est focalisé sur l'interaction pollen-abeille or l'activité de butinage est très faible en fin d'après-midi.

Bien que la viabilité du pollen soit globalement constante durant la journée d'anthèse, une diminution de la viabilité a été enregistrée à 11h. Nos résultats ont montré que cette baisse momentanée de la viabilité n'était pas imputable à la fraction de grains non viables ne se trouvant plus dans les anthères. Cette diminution pourrait alors être le résultat d'une déshydratation réversible du pollen. Pour vérifier si le pollen a subi des variations de son niveau d'hydratation au cours de la journée, un suivi de la perte en eau aurait pu être mené. Néanmoins, pour s'assurer que la déshydratation était réversible, il aurait fallu comparer la viabilité du pollen avec et sans réhydratation, or nous n'avons pas réussi à développer une méthode satisfaisante. En revanche, nous avons montré statistiquement que l'humidité relative influençait positivement la viabilité du pollen. Et en augmentant la fréquence d'irrigation, nous avons réussi à éviter cette diminution momentanée de la viabilité.

Il est à noter que lors de cette dernière expérimentation, la viabilité du pollen était plus faible à l'anthèse que les années précédentes. Des températures plus élevées ont été enregistrées cette année-là. Or, plus la température est élevée, plus l'anthèse est précoce (Rosa, 1924). Il est donc possible qu'en 2009, l'anthèse ait eu lieu plus tôt que les années précédentes et que le pollen étant en contact avec le milieu extérieur depuis plus longtemps soit légèrement déshydraté et apparaisse moins viable. Par contre, la viabilité du pollen était plus élevée à partir de 14h. Cette augmentation peut s'expliquer par le fait qu'une irrigation avait lieu à 12h, permettant au pollen de se réhydrater.

Comme le montrent nos résultats, l'aptitude à germer du pollen de *C. melo* n'est pas totalement acquise avant l'anthèse. En effet, seulement 43% des grains sont capables de germer à cet instant. Avant sa présentation, le pollen subit différentes étapes de maturation dont une importante déshydratation (Bedinger, 1992). Il se pourrait que 3 heures avant anthèse, le pollen n'ait pas fini sa déshydratation. Dans ce cas, des problèmes d'osmolarité

entre le pollen à fort contenu en eau et la solution germinative trop concentrée induiraient l'éclatement des grains de pollen, ce qui justifierait la faible aptitude à germer enregistrée. Cependant, les mêmes problèmes d'osmolarité devraient être rencontrés avec la solution de FCR. Or, avant anthèse, le pollen possède une viabilité de plus de 90%. L'étape de déshydratation n'est donc pas la cause de cette faible aptitude à germer. D'autres mécanismes de maturation doivent avoir lieu durant les dernières heures avant anthèse et conférer au pollen la capacité à germer.

L'aptitude à germer du pollen de *C. melo* est d'environ 60% à l'anthèse. Chez des espèces du genre *Philodendron*, elle varie entre 40 et 85% (Barabé *et al.*, 2008). À partir de 14h, soit 6 heures après anthèse, l'aptitude à germer diminue, jusqu'à atteindre une baisse de 15% en fin de journée.

Bien que la viabilité du pollen de *C. melo* reste constante durant la période d'anthèse, excepté lorsque le pollen subit une déshydratation réversible, son aptitude à germer diminue en fin de journée. Donc les abeilles qui butinent en fin de journée transportent du pollen moins apte à réaliser la reproduction.

### III. Qualité reproductrice du pollen en contact avec l'abeille

#### 1. Introduction

Comme cela a été présenté précédemment, *C. melo* est une plante chez laquelle la pollinisation croisée est nécessaire pour assurer la production de graines (Free, 1993). Chez cette espèce, la pollinisation est de type entomophile (Free, 1993), et le principal pollinisateur est l'abeille domestique (Rosa, 1924 ; McGregor and Todd, 1953). Au cours de ce chapitre, il a été montré que le pollen devait posséder une bonne qualité reproductrice pour assurer sa fonction de reproducteur mâle. Après avoir évalué la qualité reproductrice du pollen présenté sur la plante, nous nous sommes intéressés ici à évaluer la qualité reproductrice du pollen lors de son transport sur le corps de l'abeille. En effet, il est nécessaire que le pollen possède toute sa qualité, c'est-à-dire qu'il soit viable et apte à germer et à féconder lorsqu'il est déposé sur le stigmate.

Différentes études ont montré, qu'en fonction des espèces, la qualité reproductrice du pollen transporté sur le corps de l'abeille pouvait être modifiée. Alors que Kendall (1973) a montré que le pollen de pommier transporté sur le corps d'abeille avait la même viabilité que le pollen sur fleur à la déhiscence, Mesquida et Renard (1989) ont montré que le pollen de colza porté sur le corps de l'abeille pouvait perdre jusqu'à 45% de son aptitude à germer immédiatement après butinage, et jusqu'à 85% après deux heures de contact.

La viabilité du pollen de *C. melo* transporté par les abeilles a été étudiée par Vaissière *et al.* (1996), qui ont montré que celle-ci était plus faible lorsque le pollen était transporté par les abeilles que lorsqu'il était dans la fleur. Dans cette étude, les abeilles ont été capturées en train de butiner, sur une période de 3 heures. De ce fait, le temps de contact entre le pollen et le corps de l'abeille pouvait varier d'une abeille à l'autre. De plus, les fleurs servant de témoin ont été récoltées après la capture des abeilles. Le pollen prélevé comme témoin n'était donc pas collecté en même temps que le pollen prélevé par les abeilles.

Dans notre étude, la qualité reproductrice du pollen sur le corps de l'abeille a été étudiée en contrôlant les durées de contact. Pour cela, il a été nécessaire de travailler en conditions artificielles en réalisant manuellement un contact entre le pollen et le corps des abeilles, afin que les conditions expérimentales soient identiques d'un individu à l'autre. L'effet de ce contact a été étudié sur deux composantes de la qualité reproductrice du pollen de *C. melo*, la viabilité et l'aptitude à germer.



## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1. Matériel végétal**

Cette étude a été menée sur les cultures expérimentales réalisées en 2008 et 2009 et présentée précédemment.

### **2.2. Cohorte d'abeilles naissantes**

Afin d'homogénéiser au maximum le matériel animal (âge et conduite de cultures évitant toute contamination par des produits phytosanitaires) et d'éviter des contaminations de nos essais par du pollen étranger, une cohorte d'abeilles naissantes a été utilisée, dans laquelle une reine en ponte a été introduite. Pour obtenir des abeilles naissantes, des cadres de couvain operculé ont été placés à l'étuve (36°C, 80% d'humidité relative) durant une nuit. Les abeilles naissantes ont ensuite été placées dans une ruchette trois cadres avec la reine pondreuse (Figure 45). Un cadre de couvain était placé entre deux cadres bâtis sans couvain contenant des réserves de miel et de pollen.



**Figure 45 : Ruchette d'abeilles naissantes.**

La cohorte d'abeilles a été placée dans la partie nord du tunnel de culture du melon, dans une chambre séparée de la culture par une cloison en filet. Cette chambre a été régulièrement désherbée manuellement afin qu'il n'y ait pas de contamination par une source étrangère de pollen. Une réserve d'eau était à disposition des abeilles dans cette chambre. Les prélèvements de butineuses n'ont été effectués qu'à partir de 16 jours après la mise en place de la cohorte afin de laisser le temps aux abeilles émergentes de se développer en butineuses. Bien que le temps nécessaire à une abeille pour devenir butineuse soit normalement de 20

jours (Winston, 1991), dans des conditions perturbées comme ici, ce délai est réduit à 5 jours (Robinson, 1992).

Afin de s'assurer que les abeilles ne soient pas en contact avec du pollen avant les expérimentations, le cadre contenant du pollen a été retiré 10 jours avant le début des expérimentations.

### **2.3. Stock de pollen**

Pour constituer le stock de pollen, 320 (2008) et 640 (2009) fleurs mâles ont été récoltées sur l'ensemble de la culture avant chaque expérimentation. Les anthères ont été excisées, puis placées dans deux boules à thé. Le pollen de ces anthères a ensuite été extrait soit mécaniquement, soit chimiquement, comme décrit précédemment.

### **2.4. Collecte d'abeilles butineuses**

Vingt minutes avant le début des expérimentations, un abreuvoir contenant une solution de saccharose à 60% (p/v) et des billes en verre permettant aux abeilles de butiner sans s'engluer dans le sirop a été placé à deux mètres de la ruchette (Figure 46). Après quelques minutes de butinage, une vingtaine d'abeilles « butineuses » ont été prélevées en plaçant un sac en plastique perforé sur l'abreuvoir. Les abeilles ont ensuite été anesthésiées par le froid.



**Figure 46 : Abeilles butinant sur l'abreuvoir rempli de sirop.**

## 2.5.Contact pollen-abeille

Des embouts de coton-tige ont été utilisés comme témoins des abeilles car ils présentent une forme et une taille similaires ainsi qu'une surface « pileuse ». Pour chaque répétition, 16 abeilles et 20 embouts de coton-tige ont été placés dans les coupelles contenant le stock de pollen. Le pollen a été déposé uniformément sur les US (abeilles et témoin) par vibration au vortex pendant une minute. Chaque US a ensuite été placé dans un tube dont le couvercle était perforé de cinq trous pour permettre une aération. Les US sont restés dans leur tube durant toute la durée de contact étudiée (Figure 47).



**Figure 47 : Mise en contact du pollen avec des abeilles et les témoins.** Les individus sont placés dans les coupelles contenant le pollen (A) puis l'ensemble est vortex (B) pour permettre la mise en contact entre le pollen et les individus (C). Chaque individu est placé individuellement dans un tube percé (D, E et F).

Deux séries de durées de contact ont été testées: (i) des durées courtes 0h, 0,25h, 0,5h, 0,75h et 1h (en 2008) et (ii) des durées de contact plus longues 0h, 0,5h, 1h, 2h et 4h (en 2009).

En 2008, du fait des durées courtes, seulement quatre abeilles et quatre témoins étaient traités par durée. De ce fait, huit répétitions ont été réalisées. Pour l'évaluation de la viabilité, les plus longues durées de contact étudiées en 2009 ont permis de traiter huit abeilles et huit témoins par durée. Quatre répétitions ont été réalisées avec du pollen extrait chimiquement, alors trois ont été réalisées avec du pollen extrait mécaniquement. En ce qui concerne l'évaluation de l'aptitude à germer, 16 abeilles et 16 témoins ont pu être traités par durée, et deux répétitions ont été réalisées par type de pollen employé.

## **2.6.Évaluation de la qualité reproductrice du pollen**

Après le temps de contact requis, les US ont été placés dans un tube contenant 1ml de solution de saccharose 15% (p/v). Les tubes étaient soniqués afin de mettre en suspension les grains de pollen portés par les individus. Après avoir retiré les US des tubes, ces derniers ont servi soit (i) à la réalisation de la FCR, soit (ii) à l'évaluation de l'aptitude à germer selon les méthodes décrites précédemment. Un total de 100 grains de pollen par lame ont été analysés.

## **2.7.Analyse statistique**

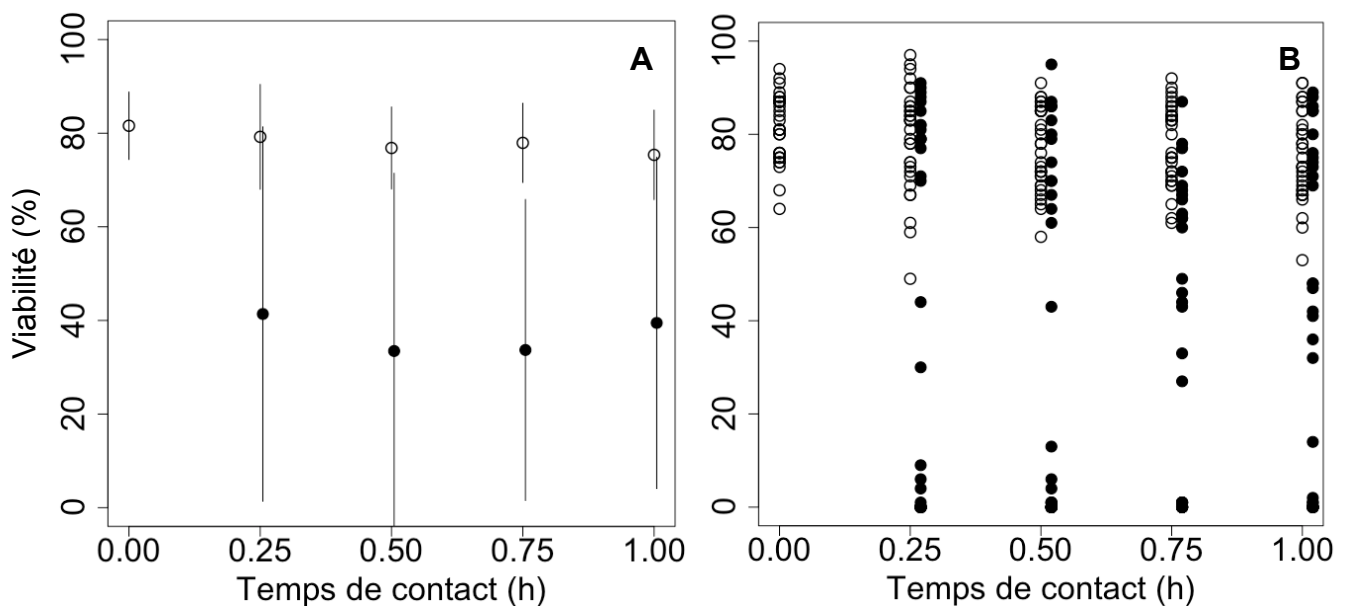
Les données ne respectaient pas la condition d'homoscédasticité (c'est-à-dire de l'uniformité de la variance dans l'ensemble des données) permettant d'utiliser un GLM. Nous avons donc privilégié l'utilisation de tests t de Student pour échantillons appariés (pollen sur témoin vs pollen sur abeille). Ces tests nous ont permis de comparer (i) les moyennes et (ii) l'étendue des valeurs (c'est-à-dire la différence entre la valeur maximale et la valeur minimale) entre les différentes modalités. Un test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour évaluer l'effet du temps sur la viabilité du pollen en 2008. Un seuil de signification de  $\alpha=0,05$  a été choisi et ces tests ont été réalisés avec le logiciel R.

## **3.Résultats**

L'effet du contact sur la qualité reproductrice du pollen a été testé avec différentes modalités. Dans un premier temps, l'expérimentation a été menée avec du pollen extrait chimiquement. Ainsi, en 2008, seule la viabilité a été mesurée, et nous nous sommes intéressés à des durées de contact courtes. Par la suite, nous avons augmenté les durées de contact et l'aptitude à germer

a pu être mesurée. Enfin, ce travail a été mené sur du pollen extrait mécaniquement, dont le sporoderme est intact.

La viabilité du pollen de *C. melo* en contact avec des corps d'abeille est deux fois plus faible que celle du pollen témoin en contact avec des embouts de coton-tige (test t,  $t=10,72$ ,  $p=5,60.10^{-12}$  ; Figure 48A). Nos résultats montrent que le contact avec le corps d'abeille induit un effet rapide, puisqu'il est mesuré dès le premier quart d'heure de contact. En revanche, durant la première heure de contact, il n'évolue pas avec la durée (KW,  $H=1,705$ ,  $df=3$ ,  $p=0,636$ ).



**Figure 48 : Viabilité du pollen de *C. melo* après de courtes durées de contact sur le corps d'abeille.** Viabilité du pollen en contact avec les témoins (●) et avec le corps d'abeille (○). **A** Viabilité moyenne du pollen mesurée sur 32 individus. Les barres représentent l'écart-type. **B** Viabilité du pollen mesurée pour chaque individu.

Les viabilités mesurées s'accompagnent de très fortes variabilités différentes de celles du témoin (test t,  $t=-11,08$ ,  $p=2,60.10^{-12}$ ), ce qui signifie que l'effet induit par le contact varie en fonction des abeilles. En effet, en observant la viabilité du pollen mesurée pour chaque individu (Figure 48B), nous pouvons nous apercevoir que certaines abeilles induisent des viabilités similaires aux témoins alors que d'autres induisent des viabilités quasiment nulles, et quelques-unes induisent des viabilités intermédiaires. Le tableau 5 montre qu'il y a à peu près autant d'abeilles qui diminuent fortement la viabilité du pollen que d'abeilles qui ne la modifient pas.

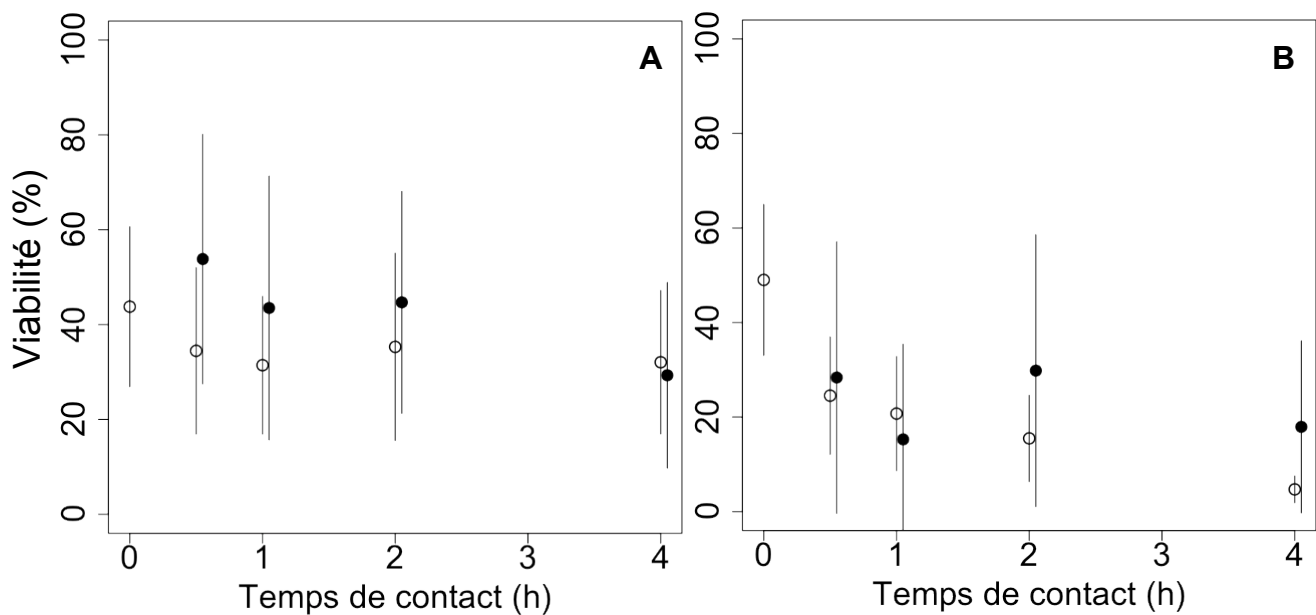
Viabilité du pollen	Durée du contact (h)			
	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>0,75</b>	<b>1</b>
≤ 20%	15	18	14	13
20% - 60%	2	1	6	7
≥ 60%	15	13	12	12

**Tableau 5 : Nombre d'abeilles induisant des viabilités très faibles, intermédiaires ou élevées en fonction de la durée du contact.**

L'effet du corps d'abeille sur la viabilité du pollen ne variant pas en fonction de la durée quand celles-ci sont courtes, elles ont été prolongées jusqu'à 4 heures pour voir si l'effet s'intensifiait au-delà d'une heure de contact (Figure 49A). De courtes durées de contact ont été également testées pour pouvoir comparer les résultats entre les deux années d'expérimentation. Les résultats obtenus ont révélés, d'une part, que la viabilité du pollen témoin était beaucoup plus faible et variable que l'année précédente. D'autre part, le corps de l'abeille a induit une modification significative de la viabilité du pollen mise en évidence par des moyennes et des étendues significativement différentes (test t,  $t=-3,10$ ,  $p=0,007$  ;  $t=-7,43$ ,  $p=2,1.10^{-6}$  respectivement). La modification enregistrée n'était pas une diminution comme c'était le cas précédemment, mais une augmentation de la viabilité du pollen. En effet, nos résultats ont montré qu'un grand nombre d'abeilles augmentaient la viabilité. Cependant, la forte variabilité de ces résultats révèle que, comme précédemment, certaines abeilles induisaient des viabilités quasiment nulles, alors que d'autres ne la modifiaient pas.

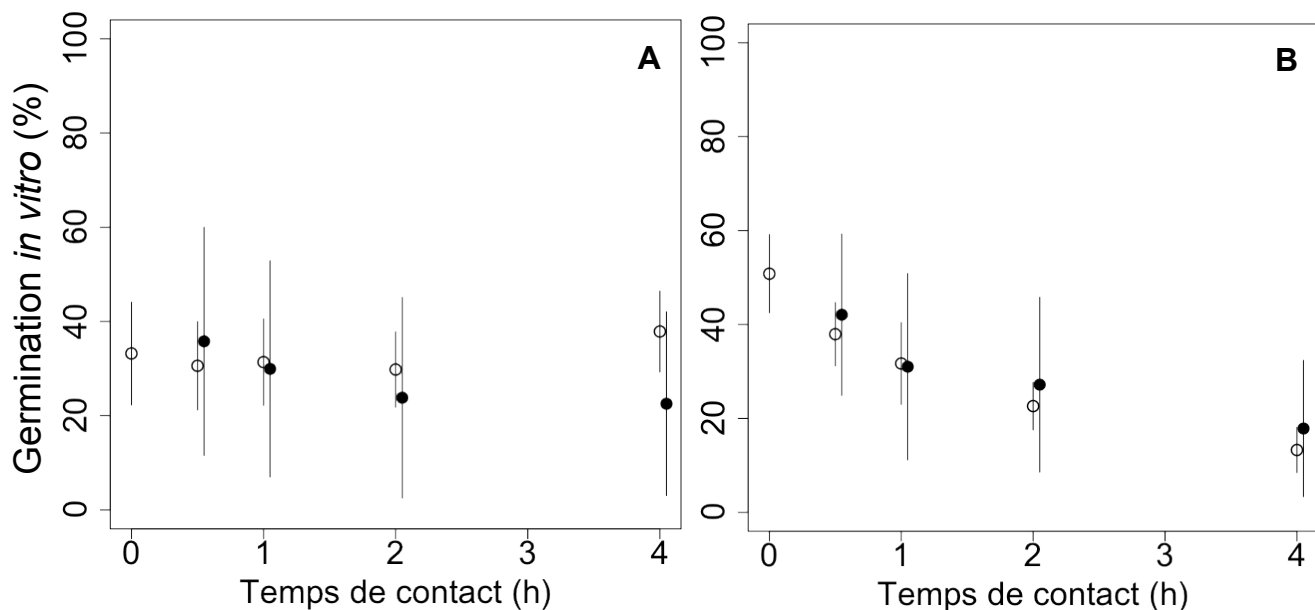
La même expérimentation menée avec du pollen extrait mécaniquement a montré des résultats plus contrastés (Figure 49B) avec des viabilités moyennes pouvant être similaires à celles du témoin ou plus élevées. L'importante variabilité des viabilités enregistrées a montré à nouveau que l'effet induit par le corps de l'abeille variait d'un individu à l'autre.





**Figure 49 : Viabilité du pollen de *C. melo* après différentes durées de contact sur le corps d'abeilles.** La viabilité a été mesurée sur du pollen extrait chimiquement (A) et mécaniquement (B). Viabilité du pollen en contact avec les témoins (●) et avec le corps d'abeille (○), les barres représentent l'écart-type, n=32.

L'effet du corps de l'abeille sur l'aptitude à germer du pollen a été évalué (Figure 50). Nos résultats ont montré que le corps de l'abeille ne modifiait pas l'aptitude à germer moyenne du pollen, que ce soit sur du pollen extrait chimiquement ( $t=0,90$ ,  $p=0,40$  ; Figure 50A) ou sur du pollen extrait mécaniquement ( $t=-1,07$ ,  $p=0,32$  ; Figure 50B). En revanche, l'étendue des valeurs significativement plus grand dans le cas d'un contact avec le corps d'abeilles a montré que l'aptitude à germer pouvait être modifiée de diverses manières par le corps de l'abeille, soit en augmentant l'aptitude à germer, soit en la diminuant ( $t=-3,72$ ,  $p=0,007$  et  $t=-6,51$ ,  $p=0,0003$  pour le pollen extrait chimiquement et mécaniquement, respectivement).



**Figure 50 : Aptitude à germer du pollen de *C. melo* après différentes durées de contact sur le corps d'abeilles.** L'aptitude à germer a été mesurée sur du pollen extrait chimiquement (A) et mécaniquement (B). Aptitude à germer du pollen en contact avec les témoins (●) et avec le corps d'abeille (○), les barres représentent l'écart-type, n=32.

#### 4. Discussion

Nos résultats ont montré, dans un premier temps, que la viabilité du pollen de *C. melo* porté sur le corps de l'abeille était diminuée de près de moitié. Ces résultats sont concordants avec ceux de Vaissière *et al.* (1996) qui ont enregistré une baisse de 25 à 75% de la viabilité. Néanmoins, contrairement à leur étude, nos résultats présentaient une très forte variabilité qui s'est révélée être une distribution de type « binomiale » de nos résultats. En effet, près de la moitié des abeilles utilisées ont induit une perte quasi-totale de la viabilité du pollen alors que les autres abeilles ne l'ont peu ou pas modifiée. Nos résultats ont donc mis en évidence que le corps de l'abeille n'induisait pas une modification homogène et constante de la viabilité, mais qu'en fonction des individus, des effets très contrastés pouvaient être enregistrés. Vaissière *et al.* (1996) avaient montré qu'en fonction du type de butineuses, les abeilles pouvaient diminuer différemment la viabilité du pollen, les butineuses mixtes induisant une baisse plus importante de la viabilité du pollen que les butineuses strictes de nectar. Dans notre dispositif expérimental, il n'était possible de déterminer le type de butineuses. Cependant, les abeilles ayant été collectées sur un abreuvoir à sirop, elles peuvent être considérées comme des

butineuses de nectar, mais il n'était pas possible de les différencier en butineuses strictes de nectar ou mixtes. Il serait possible que les résultats contrastés que nous avons obtenus soient liés au type de butineuses, c'est-à-dire que la perte quasi-totale de viabilité serait causée par des butineuses mixtes alors que l'absence de modification de la viabilité serait enregistrée sur des butineuses strictes de nectar. Cependant, dans l'étude de Vaissière *et al.* (1996), il a été montré que les butineuses strictes induisaient une perte notable de viabilité, ce qui n'est pas notre cas.

Ces effets ont été mesurés après seulement un quart d'heure de contact et ne se sont pas accentués lorsque la durée de contact a été augmentée jusqu'à une heure. La diminution très importante de la viabilité semblerait donc être induite par le contact direct du corps de l'abeille, ce qui corrobore l'hypothèse de Mesquida et Renard (1989) quant à la présence de substances modificatrices sur le corps de l'abeille plutôt qu'une perte de viabilité due à des causes physiques comme la déshydratation qui, dans ce cas, s'accentuerait avec le temps.

Lorsque la viabilité du pollen témoin était plus faible, nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois à notre connaissance, que les abeilles pouvaient également augmenter la viabilité du pollen, alors que d'autres induisaient toujours une perte quasi-totale de celle-ci. Il n'est pas surprenant que la viabilité puisse être augmentée, car il ne s'agit pas d'une mesure du nombre de grains de pollen morts ou vivants mais de l'aptitude à vivre. La faible viabilité du pollen témoin peut donc révéler une déshydratation réversible de ce dernier. L'augmentation de la viabilité causée par les abeilles pourrait être due à des composés qui passeraient du corps de l'insecte au pollen et qui le préserveraient de la déshydratation. En effet, certains lipides présents à la surface de son corps la protègent de la dessiccation (Leonhardt *et al.*, 2009). La grande variabilité de la viabilité du pollen témoin ne permet pas de conclure quant à l'effet de longues durées de contact sur la modification de la viabilité.

Dans cette étude, nous nous sommes également intéressés à l'effet du corps de l'abeille sur l'aptitude à germer du pollen de *C. melo*. Nos résultats ont montré que les abeilles induisaient également les trois réponses observées sur la viabilité. Néanmoins, l'aptitude à germer du pollen porté sur le corps de l'abeille a été globalement plus diminuée que la viabilité. Il semblerait donc que le corps de l'abeille possède des éléments qui altèrent la viabilité du pollen et d'autres qui altèrent spécifiquement l'aptitude à germer.

Nos résultats ont montré des effets beaucoup plus marqués que ceux rapportés par d'autres auteurs (Mesquida et Renard, 1989 ; Vaissière *et al.*, 1996). Cela pourrait être dû au fait que nous avons travaillé avec du pollen extrait chimiquement et mis en contact artificiellement sur

le corps des abeilles. Ce pollen, dont le pollenkitt a été retiré par le solvant d'extraction, a donc un sporoderme moins protecteur qui pourrait laisser passer davantage de substances modificatrices, ce qui expliquerait que nos résultats soient plus marqués. Néanmoins, lorsque du pollen extrait mécaniquement (qui possède un sporoderme intact) a été utilisé, les mêmes réponses ont été enregistrées, c'est-à-dire, (i) des abeilles induisant une perte quasi-totale de la viabilité, (ii) des abeilles ne la modifiant pas et (iii) des abeilles l'augmentant.

En résumé, nos résultats ont confirmé les travaux de Vaissière *et al.* (1996) en montrant par un autre dispositif expérimental que la viabilité du pollen de *C. melo* était modifiée lorsque ce dernier était en contact avec le corps de l'abeille. Par ailleurs, nous avons montré que l'aptitude à germer était également modifiée. La qualité reproductrice du pollen de *C. melo* est donc, comme chez le colza (Mesquida et Renard, 1989) modifiée par le corps de l'abeille.

Le corps de l'abeille affecterait la qualité reproductrice du pollen dès la mise en contact mais sans évolution en fonction de la durée. La modification de la qualité du pollen semblerait être différente en fonction des individus. Ainsi, certaines abeilles pourraient diminuer fortement la qualité du pollen alors que d'autres pourraient l'augmenter, enfin certaines pourraient ne pas la modifier.

## IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré (i) que la réaction fluorochromatique permettait une meilleure estimation de la viabilité du pollen de *C. melo* que la coloration d'Alexander (1969), et qu'elle pouvait être optimisée par l'ajout d'acide borique dans la solution réactionnelle, (ii) que la méthode de germination *in vitro* décrite par Matlob and Kelly (1973) permettait une bonne estimation de l'aptitude à germer du pollen chez notre modèle et (iii) que l'extraction artificielle du pollen, chimique ou mécanique, diminuait la qualité reproductrice du pollen, mais permettait toutefois son utilisation.

De plus, nous avons mis en évidence que la viabilité du pollen de *C. melo* avant anthèse était de 92% et qu'elle diminuait de 25% lors de la déhiscence mais qu'elle se maintenait au cours de la journée d'anthèse. Alors que nous avons montré que l'aptitude à germer n'était pas entièrement acquise avant anthèse, qu'elle était de 62% à la déhiscence et qu'elle diminuait au cours de la journée. Nous pouvons donc en conclure que les pollinisateurs qui butinent à différents moments de la journée transportent du pollen ayant la même viabilité. Cependant, le pollen transporté en fin de journée est moins apte à germer et donc à assurer la reproduction.

Enfin, cette étude a montré que le corps de l'abeille modifiait la qualité reproductrice du pollen de *C. melo*, et ce dès 15 minutes de contact (aucune mesure n'a été faite pour des durées de contact plus courtes) et que différentes modifications étaient engendrées. En effet, le corps de certaines abeilles diminue très fortement la qualité reproductrice du pollen alors que chez d'autres abeilles, il l'augmente. Chez quelques individus, la qualité reproductrice du pollen porté sur le corps n'est pas modifiée. Il se pourrait que des substances présentes sur le corps des abeilles induisent ces réponses contrastées.