

Spécialité : Agronomie
Dominante : APOGEE

STAGE DE FIN D'ETUDES
Formation Ingénieur Agronome – AGROSUP DIJON
Formation Initiale

**LA POLLINISATION CHEZ LE CHATAIGNIER : ETUDE DES
LIENS ENTRE VISITES DES INSECTES POLLINISATEURS,
BIOLOGIE FLORALE ET PHENOLOGIE DES ARBRES.**

(Stage réalisé du 16/03/2020 au 14/08/2020)

Eva AUSTRUY

Enseignant référent :
Sylvain Jeandroz

Maîtres de stage :
Rémy Petit et Clément Larue

Respectivement Directeur de recherche et Doctorant

INRAE Cestas, UMR 1202 BIOGECO
Biodiversité Gènes & Communautés

69 route d'Arcachon, 33610 CESTAS, France

Responsable de dominante : Sylvie Granger

RESUME

Le châtaignier est un modèle biologique à la floraison complexe de part son organisation : gynodioïque à l'échelle de la population (individus bisexués "staminés" et individus mâles-stériles "astaminés"), « andro-monoïque » à l'échelle des inflorescences de l'arbre (inflorescences mâles et bisexuées), et complexe de part sa phénologie : duodichogame, c'est-à-dire dont les organes floraux mâle et femelle ne sont pas matures simultanément mais se développent de façon séquentielle : mâle → femelle → mâle. Le syndrome de pollinisation d'un tel arbre est sujet de débats mais plusieurs études ont montré que sa pollinisation était principalement entomophile et un peu anémophile.

Les phénologies de seize châtaigniers ont été étudiées pendant six semaines (début-juin à mi-juillet 2019) et les insectes visitant les arbres ont été observés et comptés. Les abondances de 129 taxons ont été relevées tout au long de la floraison, soit 4203 insectes. Les trois ordres majeurs sont : les Coléoptères (2062 individus, 21 taxons, soit plus de 50% du total), des Hyménoptères (1086 individus, 36 taxons) et des Diptères (752, 36 taxons). Le Téléphore fauve (*Rhagoxycha fulva*), un grand coléoptère, est remarquable par son abondance (1500 individus) et son comportement : il semblerait que les partenaires se rencontrent sur les châtaigniers pour s'accoupler. Les Coléoptères et les Hyménoptères sont floricoles mais pas les Diptères. Les Hyménoptères sont sous-représentés sur les fleurs femelles des châtaigniers tandis que les Coléoptères sont sur-représentés sur ces fleurs. Ces derniers seraient donc de potentiels pollinisateurs, transportant du pollen des fleurs mâles jusqu'aux fleurs femelles. Durant la floraison, les arbres astaminés sont négligés par un certain nombre d'insectes, dont les Apidés qui sont sur-représentés sur les arbres staminés produisant du pollen. Certains coléoptères – exception faite du Téléphore fauve (*Rhagoxycha fulva*) – montrent également une préférence pour ces arbres staminés. A l'échelle des fleurs femelles, les Coléoptères sont plus souvent observés sur les fleurs femelles des arbres mâles-stériles astaminé (absence de pollen). Les visites d'insectes varient en fonction de la phénologie des arbres. L'initiation de la floraison commence par les châtons male unisexués fleuris (Pic 1), quelques insectes sont observés. Puis, les abondances sont maximales durant l'intervalle entre les deux phases mâles et lors de la floraison des fleurs mâles des châtons bisexués (Pic 2). Pour le Téléphore fauve (*Rhagoxycha fulva*), les effectifs sont maximaux lors du Pic 1 et restent élevés durant l'Intervalle et le Pic 2. Avant et après la floraison il n'y a pas, ou très peu, d'insectes observés sur les châtaigniers, excepté des Diptères dont la présence est constante tout au long de la floraison. Les Coléoptères sont majoritairement présents sur les fleurs femelles durant l'intervalle et le second pic.

Le type sexuel des châtaigniers est déterminant pour les visites d'insectes, en lien avec la production de récompenses recherchées des pollinisateurs : pollen et nectar (bisexués staminés) ou juste nectar (mâles-stériles astaminés). Pourtant les fleurs femelles les plus visitées sont celles des arbres ne produisant pas de pollen. La ressemblance entre fleurs mâles et femelles est remarquable (taille des styles, couleur, regroupement dans l'espace) et suggère un automimétisme des fleurs mâles par les fleurs femelles, notamment en raison de la rareté relative de l'imitation (fleurs femelles) par rapport à son modèle (fleurs mâles) (3900 fleurs mâles pour 1 fleur femelle en pleine floraison).

Mots-clés : automimétisme ; biologie florale ; *Castanea* ; châtaignier ; coléoptères ; duodichogamie ; entomogamie ; gynodioécie ; phénologie ; pollinisateurs ; suivi d'insectes.

ABSTRACT

The chestnut tree is a biological model with a complex flowering structure and phenology. Chestnuts are gynodioecious at tree scale (presence of bisexual individuals « staminate » and male-sterile individuals « astaminate »), and andromonoecious at inflorescences scale (male and bisexual inflorescences). They are also characterized by sequential flowering named duodichogamy, in the order male→female→male (i.e. male flowers of the unisexual catkins, female flowers of the bisexual catkin, male flowers of the bisexual catkin). Chestnut tree pollination syndrome is debated, but several studies have brought to the fore that its pollination is mainly entomophilous and somewhat anemophilous. Phenology of sixteen chestnut trees was studied for six weeks (from early-June to mid-July 2019) while insects visiting trees were monitored. Altogether, we counted 4203 arthropods throughout the flowering period, subdivided in 129 taxa and corresponding to at least 101 species. The most abundant orders were Coleoptera (2062 individuals and 21 taxa) followed by Hymenoptera (1086, 36 taxa) and Diptera (752, 36 taxa). The most abundant insect species by far was the common red soldier beetle (*Rhagoxycha fulva*, 1500 individuals). This species is also remarkable by its mating behaviour: it seems that this insect uses chestnuts trees for mating purposes, as rendezvous sites for partners to meet.

Coleoptera and Hymenoptera are floricolous but not Diptera. Hymenoptera are under-represented on female flowers of chestnut trees whereas Coleoptera are over-represented on these flowers. Coleoptera would be pollinators: carrying pollen from male flowers to female flowers. During flowering, astaminate trees (male-sterile) are disregarded by many insects, including bees, which clearly prefer staminate trees (bisexual, producing pollen). Some beetles – except common red soldier beetle (*Rhagoxycha fulva*) – also prefer staminate trees. Considering flower scale, Coleoptera are more often observed on astaminate female flowers. Insects visits on chestnut trees vary according to flowering phenology. During flowering initiation, unisexual male catkins blooming first (Peak 1), few insects are observed. Then, abundances reach their maximum during the gap between the two male sequences and during the bisexual male catkins blooming (Peak 2). For the common red soldier beetle (*Rhagoxycha fulva*), their abundance reaches a maximum at peak 1, and then remains high during the gap and the second peak. Before and after bloom, there are almost no insects observed on chestnut trees, except for Diptera whose presence is constant throughout the flowering period. Concerning Coleoptera, they are mostly present on female flowers during the gap and the second peak.

Chestnut tree sexual type is crucial for insects visits due to the production of rewards sought after by pollinators: bisexual staminate trees produce pollen and nectar whereas male-sterile astaminate trees produce only nectar. However, the most frequently visited female flowers are those of trees that do not produce pollen. The resemblance between male and female flowers is remarkable (similarity in style size, colour and spatial grouping). This suggests a self-mimicry of male flowers by female flowers in particular because of the relative rarity of the imitation (female flowers) compared to its model (male flowers) (during full bloom, only one female flower for 3900 male flowers).

Key words : automimicry ; beetles ; *Castanea* ; chestnut ; duodichogamy ; floral biology ; gynodioecy ; pollinators ; insects monitoring ; insect-pollination ; phenology.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon maître de stage Rémy Petit – directeur de recherche en biologie et génétique des populations de l’unité mixte de recherche Biodiversité Gènes & Communautés (BIOGECO) de l’INRAE de Cestas-Pierroton au sud de Bordeaux. Malgré un contexte sanitaire inquiétant qui a réduit nos échanges à des communications téléphoniques ou audiovisuelles avant même de nous être rencontrés en face à face, Rémy a su me faire découvrir pas à pas toute l’ampleur de son sujet de recherche grâce à sa patience et à sa gentillesse. Je te remercie Rémy de m’avoir intégrée à part entière dans ton équipe et de m’avoir fait profiter de ta grande expérience ainsi que de ta curiosité et de ta joie communicative.

Je souhaite remercier Clément Larue – doctorant en écologie et évolution dans le cadre d’une thèse CIFRE : partenariat entre un laboratoire de recherche (INRAE) et l’entreprise INVENIO, station expérimentale de recherche sur les fruits et légumes à Douville en Dordogne. Merci Clément pour ton humour mordant et tes idées farfelues qui nous ont bien fait rire tout au long de ce stage. Je te remercie également de m’avoir partagé ton expérience, tes méthodes et ta réflexion car grâce à toi je me sens maintenant prête à me confronter aux difficultés : il faut parfois « apprendre à voler avant de savoir à marcher ».

Je tiens également à remercier chaleureusement Tanguy Menthonnex et Julien Bonnier deux stagiaires en troisième année de licence à l’université de Bordeaux, qui ont rejoint l’équipe pour un mois et demi. Ils ont apporté leur bonne humeur avec eux et sont venu renforcer les rangs de notre équipe de terrain. Ils ont aussi fourni un gros travail en laboratoire sur la compréhension de la morphologie des fleurs de châtaigniers.

Enfin, je suis reconnaissante à Marie-Lise Benot et Virgil Fievet, tout deux enseignants chercheurs à l’université de Bordeaux, pour leur écoute lors de nos discussions et leur aide dans la construction de notre réflexion. Je suis aussi très reconnaissante à Gaëlle Basset, sans qui ce mémoire n’aurait pas lieu car c’est lors de son stage de première année de master qu’elle a constitué la base de données sur les insectes que j’exploite à présent.

Cette expérience fut pour moi d’une très grande richesse tant sur le plan humain que professionnel.

TABLE DES MATIERES

1. Introduction	1
2. Contexte.....	5
3. Problématisation	7
4. Hypothèses de travail.....	7
5. Matériel et méthodes.....	9
5.1. Zone d'étude	9
5.2. Matériel biologique.....	9
5.3. Dispositif expérimental.....	9
5.4. Methodes	11
5.4.1. Phenologie.....	11
5.4.2. Suivi des insectes	11
5.4.3. Données.....	13
5.4.4. Traitements statistiques.....	14
6. Résultats.....	16
6.1. Phénologie	16
6.1.1. Caractère floricole.....	17
6.1.2. Visites des fleurs femelles.....	18
6.1.3. Préférences entre types sexuels a l'échelle de l'arbre.....	18
6.1.4. Préférences entre types sexuels a l'échelle des fleurs femelles	21
6.1.5. Préférences entre types sexuels en fonction de l'échelle d'observation : fleurs femelles ou arbre entier	21
6.1.6. Influence de la phénologie sur les visites des fleurs femelles.....	21
7. Discussion.....	23
8. Perspectives	27
9. Conclusion	28
10. Liste des références bibliographiques	30
11. Annexes.....	33

GLOSSAIRE

Allopolinisation : synonyme de pollinisation croisée (ou aussi allogamie).

Ambophilie : pollinisation à la fois par le vent et par les insectes pollinisateurs.

Androgyne : qui tient des deux sexes, se dit des plantes qui ont des fleurs mâles et des fleurs femelles dans la même inflorescence, mais dont aucune fleur n'est hermaphrodite.

Andro-monoécie : c'est le fait qu'un même pied d'une plante porte à la fois des fleurs hermaphrodites et des fleurs uniquement mâles.

Anémophilie : pollinisation par le vent.

Anthèse : période de la floraison pendant laquelle une fleur est complètement ouverte et fonctionnelle.

Astaminé : sans étamines donc sans pollen.

Auto-incompatibilité : mécanisme empêchant l'autofécondation : d'une fleur par elle-même, entre fleurs d'une même plante, ou parfois entre fleurs de plantes génétiquement liées.

Automimétisme : pour une espèce végétale, c'est l'imitation l'imitation de l'un des deux sexes par l'autre (forme des pièces florales, couleur, odeur...).

Cantharophilie : cas particulier de pollinisation entomophile ; pollinisation par les coléoptères.

Dioécie : séparation des sexes ; individus monosexués soit mâles, soit femelles.

Remarque : monosexué s'utilise pour parler d'un individu et unisexué pour parler d'une fleur.

Dichogamie : décalage chronologique entre la période de maturité des gamètes mâles, et celle de réceptivité des gamètes femelles.

Duodichogamie : dichogamie particulière ; séquence de fleurs mâles, puis femelles, puis mâles.

Entomophilie : pollinisation par les insectes.

Gynodioecie : Caractère des plantes présentant des pieds à fleurs hermaphrodites et des pieds à fleurs femelles.

Monoécie : caractère d'une plante avec des fleurs mâles et femelles séparées mais portées par le même pied.

Protandrie : organes mâles (anthères) matures avant les organes femelles (stigmates).

Protogynie : inverse de protandrie ; organes femelles matures avant les organes mâles.

Syndrome de pollinisation : convergence d'un ensemble de traits floraux sélectionnés au cours de l'évolution résultant d'adaptations aux divers vecteurs de pollinisation, biotiques ou abiotiques.

Staminé : avec étamines donc production de pollen (abondant).

LISTE DES SIGLES, ACRONYMES ET ABREVIATIONS

BBCH : “Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und CHEmische Industrie” (expression allemande) ; échelle destinée à identifier les stades de développement phénologique d’un végétal

HTS : “High-Throughput Sequencing” (expression anglaise) ; séquençage haut débit

INRAE : Institut National de Recherche en Agriculture, alimentation et Environnement

MAEC : Mesures Agro-Environnementales et Climatiques

NGS : “Next-Generation Sequencing” (expression anglaise) ; synonyme de séquençage haut débit

SPIPOLL : Suivi Photographique des Insectes POLLinisateurs

♀ : de sexe féminin, femelle

♂ : de sexe masculin, mâle

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Biologie Florale Du Chataignier. (Photographies : C. Larue Et R. Petit, 2019, Austruy, 2020)	1
Figure 2 : Photographie D'un Rameau De Chataignier Stamine En Fleur (Adapte D'apres Larue Et Petit, 2019) .	4
Figure 3 : Detail D'une Inflorescence Femelle A La Base D'un Chaton Male Bisexue De Chataignier Hermaphrodite (Photographie : Larue Et Petit, 2019)	6
Figure 4 : Ensemble Des Chataigniers Geolocalises Sur Le Site De La Grande Ferrade (Adapte De R. Petit, C. Larue, 2019).	8
Figure 5 : Geolocalisation Des 16 Individus Etudies : 8 <i>C. Sativa</i> Et 8 Hybrides (Petit, Larue, 2019).	8
Figure 6 : Dispositif Experimental De L'etude Et Suivi Des Insectes	10
Figure 7 : Phenologie Des 16 Chataigniers Suivis En Fonction Du Temps (Larue <i>Et Al.</i> , 2020).....	16
Figure 8 : Repartition Des Insectes Sur Les Chataigniers Pendant Et Hors Floraison.	17
Figure 10 : Photographies D'insectes Sur Des Chatons Males. (Photographies : R. Petit Et C. Larue, 2019).	18
Figure 9 : Photographies D'insectes Sur Fleurs Femelles. (Adapte De Larue <i>Et Al.</i> , 2020).	19
Figure 11 : Comparaison Des Effectifs D'insectes.	20
Figure 12 : Visites Des Insectes A L'echelle De L'arbre Entier Et Des Fleurs Femelles En Fonction Des Stades Phenologique Des Chataigniers A La Floraison (Adapte D'apres Larue <i>Et Al.</i> , 2020).....	22
Figure 13 : Couples De Telephores Fauves (<i>Rhagozycha Fulva</i>) Sur Des Chatons Males De Chataigniers. (Photographies Larue <i>Et Al.</i> , 2020).	24
Figure 14 : Telephore Fauve (<i>Rhagozycha Fulva</i>) Perche Sur Une Inflorescence Femelle. (Larue <i>Et Al.</i> , 2020).	24
Figure 15 : Illustration De L'automimetisme. (Adapte De Larue <i>Et Al.</i> , 2020).....	26
Figure 16 : Diagramme D'organisation Du Travail Et Des Objectifs.....	33
Figure 17 : Test De Wilcoxon Unilateral Pour Series Appariees, Script R	34
Figure 18 : Test De La Probabilite Exacte De Fisher, Script R	35
Figure 19: Test De Wilcoxon Bilateral Simple, Script R.....	36

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caracteristiques Des 16 Chataigniers Suivis.....	9
Tableau 2 : Echelle Phenologique Bbch Adaptee Au Cas Du Chataignier.....	12
Tableau 3 : Table De Conversion Du Code Phenologique Bbch En Pourcentage De Fleurs Matures.	12
Tableau 4 : Tableau Recapitulatif Des Tests Statistiques Effectues.....	37
Tableau 5 : Extrait De La Base De Donnees.....	38

1. INTRODUCTION

En 1984, dans le livre *Pollinisation et productions végétales*, Paul Pesson et Jean Louveaux définissent la pollinisation – « transport des grains de pollen des étamines sur les stigmates » – comme un mécanisme dépendant « de divers facteurs : la répartition des sexes [de la plante] dans l'espace et le temps, les agents vecteurs (animaux, vent, eau) et les adaptations réciproques fleurs-vecteurs polliniques ». Cette définition pose clairement les divers éléments à l'origine de la description et de l'utilisation des « syndromes de pollinisation » pour organiser la diversité florale selon des critères à la fois écologiques et fonctionnels (Dellinger, 2020). Les facteurs énoncés renvoient à une multitude de structures, de fonctionnements mais aussi d'adaptation des plantes dans leur environnement. Plus précisément ils désignent respectivement :

- une séparation ou non des sexes en différents types de fleurs (hermaphrodites, mâles, femelles) portées par le même individu (monoécie) ou séparées sur deux individus distincts (dioécie) (Charlesworth, 2002) ;
- des phénologies décalées dans le temps (dichogamie) entre types sexuels (et/ou types de fleurs), fleurs femelles matures avant les fleurs mâles (protogynie) et inversement (protandrie) (Leonard, 2013) ;
- une diversité de vecteurs biotiques ou abiotiques permettant la dissémination du pollen sur différentes distances, l'export ou l'import de quantités de pollen variées, et des surfaces réceptives plus ou moins précises... (Harder et Wilson, 1997).
- les évolutions morphologiques florales ou gamétophytiques des plantes, plus adaptées à une dispersion par le vent, l'eau, les insectes ou les animaux (structure et ornementation des grains de pollen, densité, taille...) et des coévolutions avec des vecteurs animaux : spécialisation de la plante mais aussi de l'animal (morphologie, comportement...) (Crepet et Niklas, 2009 ; Olsson, *et al.*, 2000 ; Dellinger, 2020).

Les combinaisons entre ces facteurs font l'objet de nombreuses études, cependant certains raccourcis sont souvent pris, notamment une simplification excessive d'interactions plante-pollinisateur complexes (Ollerton *et al.*, 2009 ; Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). Par exemple, les visiteurs des fleurs sont considérés comme des pollinisateurs, sans tenir compte de leur efficacité pour le transfert de pollen (Dellinger, 2020). En effet, pour que la pollinisation ait lieu deux conditions sont à vérifier obligatoirement : l'export de pollen depuis les étamines d'une part mais aussi sa réception sur les stigmates des fleurs de la même espèce (Larue *et al.*, 2020). La classification en syndrome de pollinisation n'est pas toujours simple et certains traits morphologiques initialement interprétés comme indicatifs d'une pollinisation anémophile (par le vent) ont été réinterprétés comme pouvant aussi être associés à une pollinisation entomophile (par les insectes) (Dellinger, 2020 ; Larue *et al.*, 2020).

Le châtaignier européen, *Castanea sativa*, est un cas d'espèce arboricole à la biologie florale particulièrement complexe qui illustre parfaitement ces diagnostics trop hâtifs.

Jusqu'alors, de nombreux castanéiculteurs pensaient que les châtaigniers étaient anémogames – pollinisés principalement par le vent (Larue *et al.*, 2020). Dans des travaux récents, il a été suggéré que le châtaignier est une espèce « ambophile », c'est-à-dire à



FIGURE 1 : BIOLOGIE FLORALE DU CHATAIGNIER. a) Arbre chimérique illustrant la différence morphologique liée au type sexuel car à moitié astaminé à gauche (discrets châtons verts) et à moitié staminé à droite (longs châtons jaunes voyants) ; b) et c) Branche de l'année avec rameaux unisexués et bisexués pour un arbre astaminé (b), staminé (c) ; d) et e) Détail d'un rameau bisexué d'un arbre astaminé (sans étamines) (d), staminé (avec étamines) (e) (PHOTOGRAPHIES : C. LARUE ET R. PETIT, 2019, AUSTRUY, 2020)

pollinisation mixte, assurée principalement par le vent et de façon complémentaire par les insectes (Deguines *et al.*, 2014). De premières expérimentations ont montré qu'en empêchant les insectes d'accéder aux fleurs de châtaignier, les rendements chutaient d'un facteur 2,5 au moins (De Oliveira *et al.*, 2001), illustrant l'importance de ce service écosystémique pour la production de châtaignes. De nouvelles expérimentations viennent confirmer que les insectes pollinisateurs sont bien les principaux vecteurs de pollen chez ces arbres (Larue *et al.*, 2020). La floraison massive (Groom, 1909), le pollen lourd (Chapa, 1984) et collant (Bruneton-Governatori, 1984), la présence de récompenses abondantes (Faegri et Van der Pijl, 1979 ; Feijó *et al.*, 1999) et le parfum fort (Zhang *et al.*, 2018) sont bien des caractéristiques des espèces entomophiles.

Le cas du châtaignier est particulièrement original en raison de l'organisation alambiquée « de son sexe », selon trois niveaux d'organisation (FIGURE 1).

Tout d'abord la fonction de reproduction générale, femelle, mâle ou hermaphrodite, est déterminée à l'échelle de l'arbre par deux grands types sexuels distincts. Il s'agit d'un polymorphisme sexuel. Ce syndrome, chez le châtaignier, correspond à une gynodioecie, c'est-à-dire la coexistence d'individus bisexués (mâle et femelle) et d'individus femelles au sein d'une même population naturelle (Manicacci, 1993). Les cas de séparations partielles des sexes sont rares mais concernent néanmoins plus de 250 genres d'angiospermes (Dufaÿ *et al.*, 2014). Chez le châtaignier, les individus femelles sont aussi appelés des « mâles-stériles » (De Oliveira *et al.*, 2001). Pour chacun des deux types sexuels, les organes reproducteurs sont similaires et organisés de la même façon. Le terme de « mâles-stériles » utilisé pour décrire le type sexuel « femelle » signifie que ces individus ont perdu leur fonction de reproduction mâle au cours de l'évolution. Les étamines de ces fleurs sont atrophiées ou absentes et produisent peu ou pas de pollen. (Raud, 1961).

Au second niveau d'organisation, se trouve deux types de rameaux distincts : les rameaux unisexués (mâles) et les rameaux bisexués (androgynes : mâle et femelle). Ces rameaux portent un ou deux types d'inflorescences. Les premiers portent des châtons unisexués mâles ; les seconds, des châtons mâles – appelés châtons bisexués pour les différencier des châtons unisexués – à la base desquels se trouvent quelques inflorescences femelles (

FIGURE 2).

Enfin le dernier niveau d'organisation est celui de la fleur. Il y en a de deux types : les fleurs mâles, rassemblées en glomérules d'environ 6 fleurs, eux-mêmes regroupés en spirale le long des châtons (Feijó *et al.*, 1999), et les fleurs femelles, groupées par trois en inflorescences femelles (FIGURE 3). Aucune fleur n'est donc à proprement parler hermaphrodite (bien que quelques rares cas de fleurs hermaphrodites aient été observés durant ce stage).

En raison de ces différences morphologiques entre fleurs, les castanéiculteurs désignent les châtaigniers mâles-stériles par le terme « astaminés » (sans étamines) et les hermaphrodites par « staminés » (avec étamines) (FIGURE 1) (Morettini, 1949 ; Solignat *et al.*, 1952 ; Solignat et Chapa, 1975 ; Valdiviesso *et al.*, 1993). A noter qu'il existe des mécanismes d'auto-incompatibilité, qui limitent très fortement l'autofécondation chez cette espèce (Hasegawa *et al.* 2015). Les individus bisexués, donc staminés, ne peuvent pas s'auto-polliniser.



FIGURE 2 : PHOTOGRAPHIE D'UN RAMEAU DE CHATAIGNIER STAMINE EN FLEUR (ADAPTE D'APRES LARUE ET PETIT, 2019)

Légende :

- 1 4 chatons unisexués mâles en fleur (pleine floraison)
- 2 3 chatons unisexués mâles en train de brunir à leurs extrémités (fin floraison)
- 3 Châton unisexué mâle immature : glomérules non ouverts (avant floraison)
- 4 Châtons bisexués, mâle et femelle, immatures

♂ Châton mâle bisexué

♀ Inflorescence femelle

Par la suite, les termes staminés et astaminés seront utilisés pour faire référence aux châtaigniers bisexués et femelles respectivement.

Ainsi, cette espèce est fonctionnellement gynodioïque à l'échelle de la population d'arbres, « andro-monoïque » au niveau des inflorescence et monoïque à l'échelle de la fleur. Quant à la phénologie, le châtaignier fait parti des très rares cas d'espèces duodichogames : seulement cinq genres sont répertoriés dans la compilation de Renner (2014). Cela signifie que chaque individu produit de façon séquentielle différents groupes de fleurs, le plus souvent dans l'ordre mâle, femelle, mâle (Hasegawa *et al.*, 2017 ; Larue *et al.*, 2020).

Cette répartition atypique des sexes est une opportunité pour la recherche. Elle peut par exemple aider à comprendre les préférences des insectes pour certaines fleurs et leurs conséquences sur le succès de pollinisation de châtaigniers.

2. CONTEXTE

Cette étude s'inscrit dans des objectifs plus généraux.

Une grande proportion des variétés cultivées en Europe et dans le monde sont des châtaigniers astaminés (Martin *et al.*, 2017) ne produisant pas de pollen, récompense attractrice pour les insectes pollinisateurs. Ces derniers favorisent le dépôt de grains de pollen sur les stigmates des fleurs femelles lors de leurs visites. Toutefois, la perte de la fonction reproductrice mâle n'est pas un syndrome lié à la domestication puisque ces arbres existent à l'état naturel. En effet, au nord de l'Espagne se trouve une forêt Atlantique naturelle abritant de nombreux châtaigniers, Fragas do Eume en Galice, parmi lesquels des individus staminés comme astaminés (J. Fernandez-Lopez, R. Petit et C. Larue, comm. pers.). Cela suppose que ces châtaigniers astaminés ont un avantage par rapport aux arbres staminés, assurant leur maintien au sein de populations naturelles. Les pistes de réflexion mènent vers des mécanismes compensatoires tels qu'une plus grande production de fruits liée à la spécialisation sur une seule fonction sexuelle, ou encore un évitement des interférences dues à l'auto-pollination, limitant l'autofécondation et la dépression de consanguinité associée, ... (Dufay et Billiard, 2011) ; ces mécanismes sont en lien avec l'étape de pollinisation. La réussite de cette dernière est donc primordiale car elle détermine en partie le succès reproducteur de l'individu. Le terme de valeur sélective (*fitness* en anglais) désigne ce succès reproducteur, Brown *et al.* (1993) parle aussi de « pouvoir reproducteur ». Cette probabilité chez les plantes repose en partie sur l'export et l'import de pollen entre individu. Ainsi, l'étude de la pollinisation devrait permettre de mieux comprendre les différences de succès reproducteur entre châtaigniers.

Enfin, le point clé de ce travail repose sur la connaissance de la biologie de cet arbre fruitier. Les individus astaminés ne produisent pas de pollen. Or, la production de fruits nécessite l'import de pollen extérieur, il leur faut donc un autre châtaignier staminé donneur de pollen dans les alentours et des insectes pollinisateurs pour le leur apporter. La connaissance des interactions entre les châtaigniers et les pollinisateurs permettrait d'améliorer la conception et la gestion des vergers pour augmenter la production, tout en s'appuyant sur la biodiversité locale (diversité intraspécifique des châtaigniers, diversité interspécifique des insectes pollinisateurs). Des mesures favorisant ce service écosystémique pourront être mises en place et augmenter la résilience de ces systèmes de culture.

Un diagramme posant les objectifs propres au travail et les sources des données est disponible en annexe (FIGURE 16FIGURE 16).

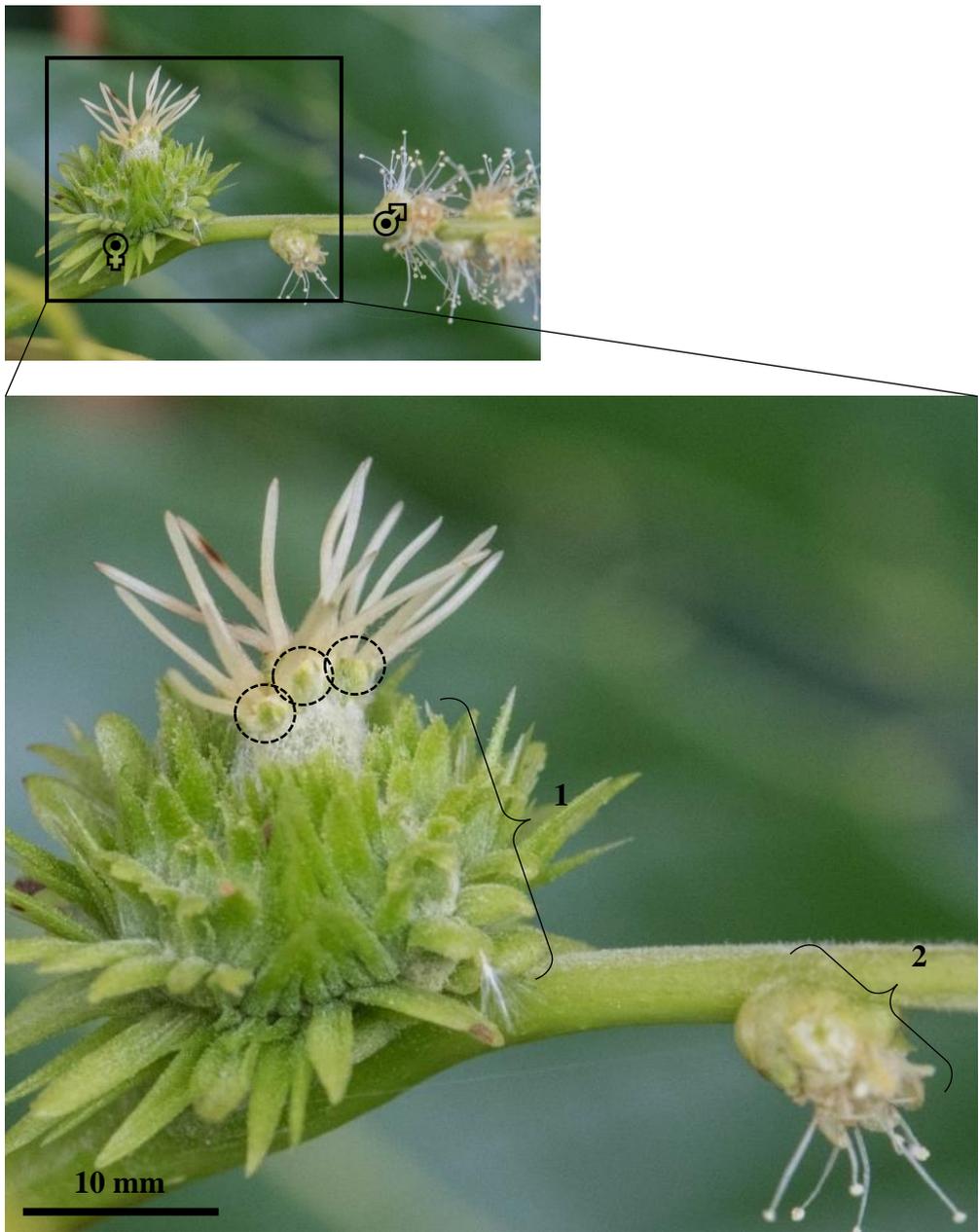


FIGURE 3 : DETAIL D'UNE INFLORESCENCE FEMELLE A LA BASE D'UN CHATON MALE BISEXUE DE CHATAIGNIER HERMAPHRODITE (PHOTOGRAPHIE : LARUE ET PETIT, 2019)

Légende :

- 1 Bractées de l'inflorescence femelle (future bogue)
- 2 1 glomérule du châton mâle bisexué avec les anthères des fleurs développées
- 3 fleurs femelles avec leurs styles et stigmates formés

3. PROBLEMATISATION

Plusieurs chercheurs ont récemment montré que le châtaignier est une espèce principalement entomophile (De Oliveira *et al.*, 2001 ; Larue *et al.*, 2020) et ont observé une forte variabilité intraspécifique chez cet arbre. Celle-ci s'illustre par les grandes différences morphologiques entre individus de la même espèce, liées, d'une part au polymorphisme sexuel (De Oliveira *et al.*, 2001 ; Raud, 1961), d'autre part aux variations entre arbres du même type sexuel dans les formes, les tailles, dans la présentation des rameaux portant les inflorescences ou encore dans les dates de floraison (Hasegawa *et al.*, 2015 ; Larue *et al.*, 2020). La question se pose de savoir quels effets ont ces différences sur les insectes pollinisateurs du châtaignier car l'attraction de ces derniers est essentielle pour la pollinisation et donc la reproduction de ces arbres. Les leviers d'action d'un castanéiculteur sont ses choix concernant l'espèce de châtaignier, les variétés implantées (monoculture ou mélange variétal), leur type sexuel, ainsi que ses choix de conduite du verger (organisation spatiale des variétés, itinéraire technique cultural avec ou sans traitements insecticides, fauche tardive ou non de la strate herbacée sous les arbres, ...). Ainsi, l'enjeu pour la conception des vergers et leur gestion est de déterminer le lien entre la bonne pollinisation des arbres et leurs caractères phénotypiques visibles par les castanéiculteurs (basées sur des variations du génotype). Ce sont les fleurs, organes reproducteurs des châtaigniers, qui produisent les récompenses attirant les insectes pollinisateurs. Cela en fait de bons indicateurs pour essayer de prédire la pollinisation des arbres. Toutefois, un indicateur n'est utile que s'il remplit deux critères : être précis sur la mesure du caractère ou de son proxy et être facile d'utilisation pour les professionnels. Or les fleurs sont facilement observables. L'objectif de ce mémoire est donc d'étudier les liens entre le « sexe » des arbres et les visites des insectes pollinisateurs. La question de recherche est la suivante :

Comment les caractéristiques liées à la reproduction des châtaigniers influencent-elles les visites d'insectes pollinisateurs ?

4. HYPOTHESES DE TRAVAIL

PREREQUIS : Les visites des insectes pollinisateurs sont conditionnées par le « pouvoir d'attraction » des arbres en lien avec les récompenses qu'ils peuvent offrir à ces insectes, notamment le nectar et le pollen, produits par les fleurs (Flacher *et al.*, 2017 ; Albouy, 2018, Ruedenauer, 2019 ; Dellinger, 2020).

HYPOTHESE 1 : Certains insectes sont déterminants pour la bonne pollinisation des châtaigniers. Ils favorisent la bonne dispersion du pollen entre arbres.

HYPOTHESE 2 : Les insectes visitant les fleurs ne sont pas tous efficaces pour la pollinisation du châtaignier, mais plus ils sont abondants sur un châtaignier, meilleure est la pollinisation de l'arbre.

HYPOTHESE 3 : Les variations de certains caractères des arbres ont une influence sur les visites des insectes.

HYPOTHESE 4 : Plus un châtaignier produit de pollen et de nectar, plus les insectes pollinisateurs sont abondants sur l'arbre. Certains châtaigniers ne produisent pas de pollen (astaminés) ils seront donc moins visités.

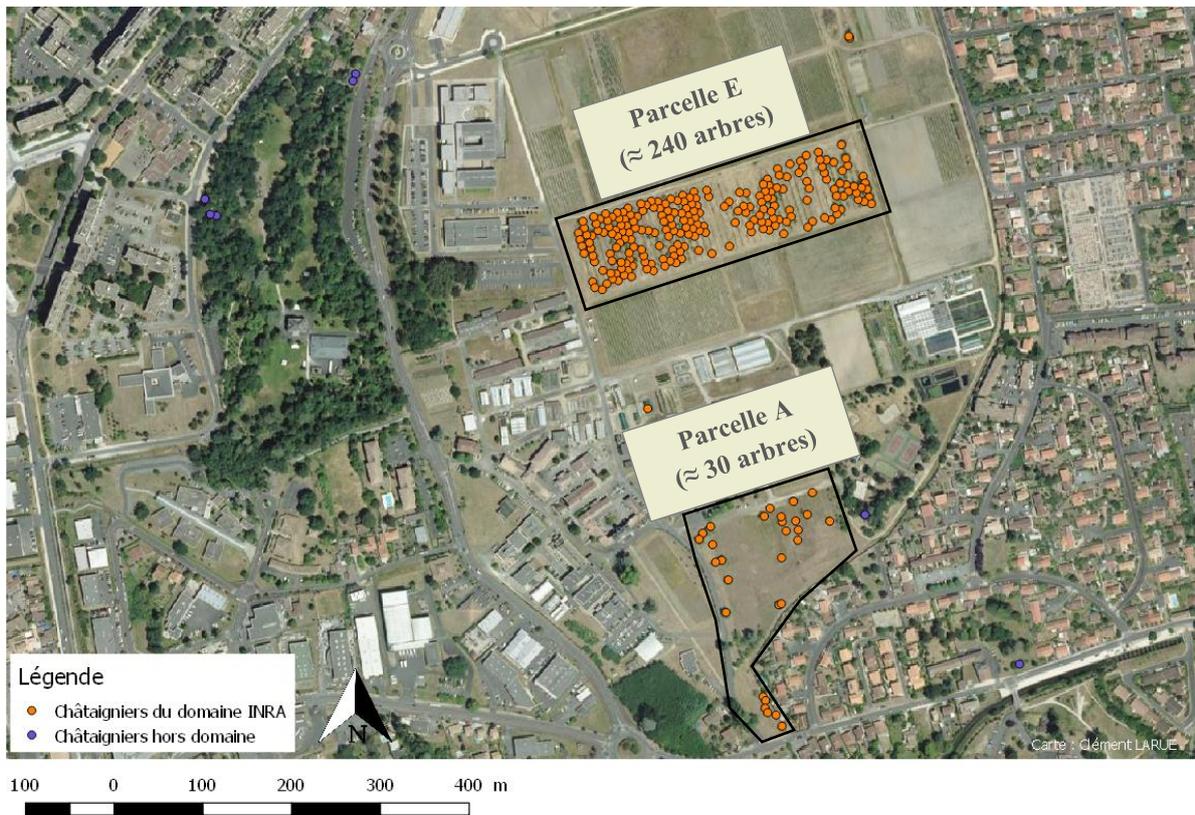


FIGURE 4 : ENSEMBLE DES CHATAIGNIERS GEOLOCALISES SUR LE SITE DE LA GRANDE FERRADE (264 dans le dispositif et 9 autour du domaine (parcs, jardins privés)) (ADAPTE DE R. PETIT, C. LARUE, 2019).

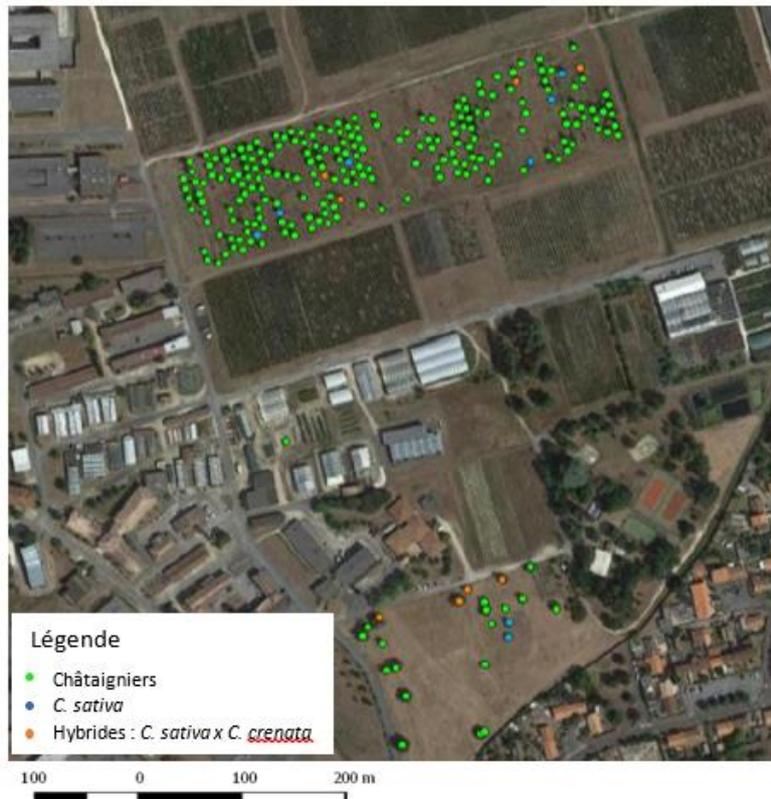


FIGURE 5 : GEOLOCALISATION DES 16 INDIVIDUS ETUDIES : 8 *C. SATIVA* ET 8 HYBRIDES (PETIT, LARUE, 2019).

5. MATERIEL ET METHODES

5.1. ZONE D'ETUDE

L'étude a été réalisée au domaine expérimental de la Grande Ferrade de l'INRAE, à Villenave d'Ornon, au sud de Bordeaux (FIGURE 4). Il s'agit d'un verger de 264 châtaigniers dont 75 % sont staminés et 25 % sont astaminés, avec une centaine de géotypes différents, appartenant à trois espèces de châtaigniers : *Castanea sativa* (châtaignier européen), *Castanea crenata* (châtaignier japonais) et *Castanea mollissima* (châtaignier chinois) et ainsi que les différents hybrides entre ces trois espèces. Les sols superficiels et pauvres sont des lithosols, aussi appelés « sols squelettiques », acides, à faible teneur en matière organique et à la texture grossière (d'après Géoportail, Carte géologique des sols).

5.2. MATERIEL BIOLOGIQUE

Seize individus ont été suivis (FIGURE 5). Il y a deux espèces de châtaigniers et huit variétés différentes. Quatre variétés sont astaminées et quatre sont staminées, chacune représentée par deux individus greffés ou ramets (TABLEAU 1). Ainsi, les deux espèces sont répliquées huit fois chacune, les types sexuels huit fois chacun et les variétés deux fois.

TABLEAU 1 : CARACTÉRISTIQUES DES 16 CHATAIGNIERS SUIVIS

Espèce	Type sexuel	Nom de la variété	Identifiant arbre 1	Identifiant arbre 2
<i>C. sativa</i>	Astaminé	Dauphine	A64C	E76I
<i>C. sativa</i>	Astaminé	Précoce des Vans	E40R	E72S
<i>C. sativa</i>	Staminé	Despont n°3	A65F	E78E
<i>C. sativa</i>	Staminé	Variété 381	E43O	E52J
Hybride	Astaminé	Bétizac	A58O	E80E
Hybride	Astaminé	Marlhac	A66Q	E73D
Hybride	Staminé	Maridonne	A60Q	E50P
Hybride	Staminé	Marigoule	A44Q	E49K

Dans la mesure du possible les deux ramets d'un arbre sont sur des parcelles différentes (parcelles A et E), sinon le plus loin possible l'un de l'autre afin d'éviter au maximum de confondre l'effet variétal avec celui de l'environnement local.

5.3. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Le dispositif expérimental est présenté en FIGURE 6. Il s'agit du suivi dans le temps d'un petit nombre d'individus en place au sein d'un verger. Deux facteurs indépendants sont étudiés, l'espèce et le type sexuel des individus, constituant les deux modalités du dispositif. Pour chaque facteur il y a quatre sous-modalités que sont les différentes variétés et deux réplicats par sous-modalité, c'est-à-dire, deux clones par variété.

Ce dispositif permet de tester des effets à la fois liés à l'espèce et au type sexuel (astaminé ou staminé) sur les insectes pollinisateurs et, *a posteriori*, d'éventuels effets variétaux, voire individuels. Les données ont été acquises en 2019 en prévision de ce stage. La campagne de terrain de cette année 2020 a pour but de compléter et préciser les analyses présentées ci-après.

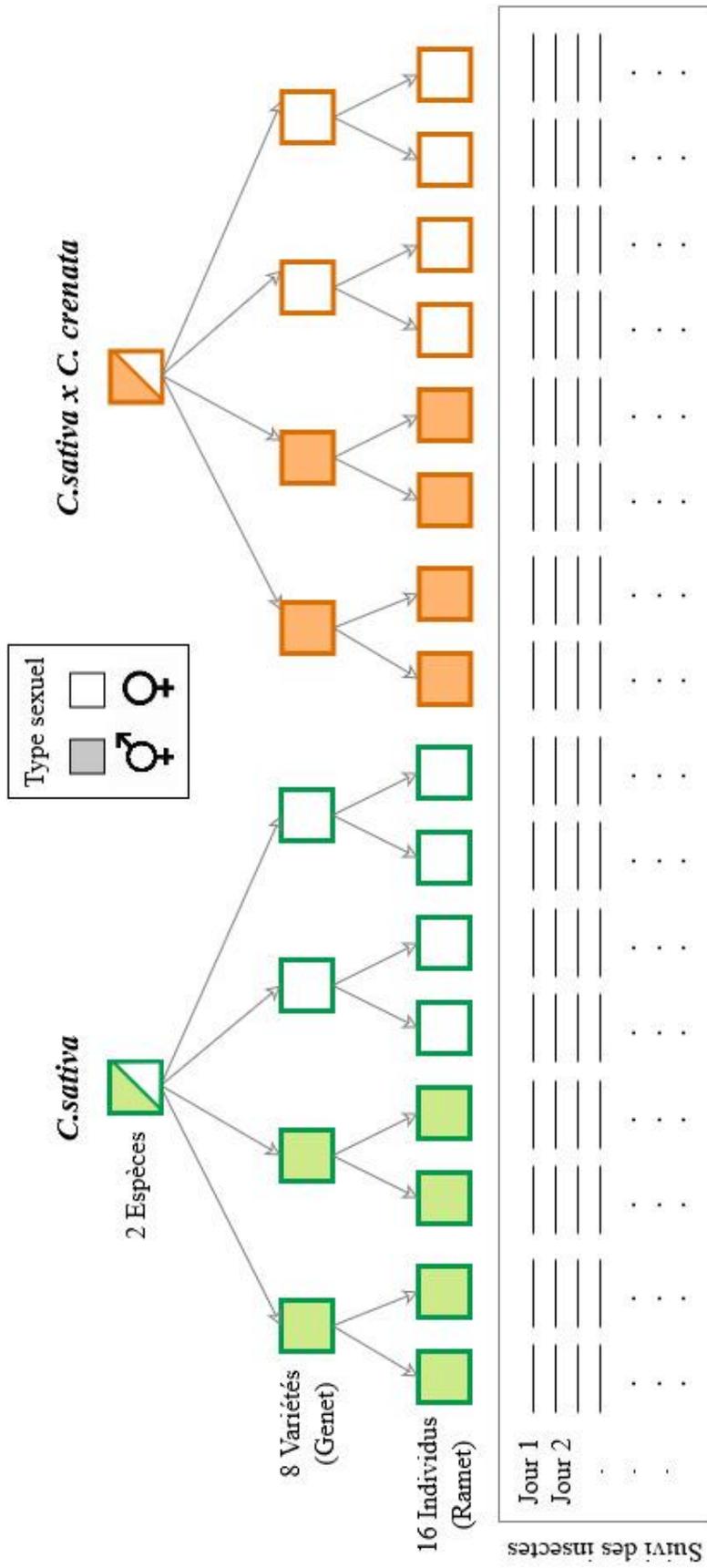


FIGURE 6 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL DE L'ETUDE ET SUIVI DES INSECTES

5.4. METHODES

5.4.1. PHENOLOGIE

La phénologie des 16 arbres du dispositif a été suivie de la première semaine de juin (04/06/2019, jour julien 152) à mi-juillet (12/07/2019, jour julien 190), juste après le début de floraison des arbres les plus précoces. Une dizaine de relevés par arbre ont été effectués sur cette période de six semaines (162 relevés au total). Huit dates au mois de juin : 04/06, 06/06, 11/06, 13/06, 19/06, 24/06, 26/06, 28/06, et quatre au mois de juillet : 02/07, 05/07, 08/07, 12/07, correspondant à la période de floraison des châtaigniers de mi-juin à mi-juillet d'après la littérature (GRPTCMC, 2010). L'échelle internationale BBCH (Meier, 2001) a été utilisée pour identifier les stades de développement phénologiques des châtaigniers. Cette échelle phénologique utilisée par les organismes agricoles (Arvalis, Syngenta...) a été adaptée pour le châtaignier par l'INRAE (Teresa Barreneche, comm. pers.) (TABLEAU 2).

Le protocole mis en place consiste à observer une dizaine de rameaux par arbre et de procéder à une première détermination du stade phénologique, sur le terrain, à l'aide de l'échelle BBCH présentée dans le TABLEAU 2. Quelques rameaux sont photographiés pour une identification *a posteriori*.

Enfin, une synthèse des codes déterminés par observation et par photographie est réalisée, s'il y a un litige, ce sont les données issues des photographies qui sont retenues pour la base de données. A la suite, une échelle de conversion des codes phénologiques en pourcentage de fleurs à maturité, émettant du pollen pour les châtons mâles et réceptives pour les fleurs femelles, a été construite (TABLEAU 3) (Larue *et al.*, 2020).

Afin de pouvoir déterminer la proportion de la canopée qui a été étudiée, une mesure du diamètre de ces branches et du diamètre du tronc de l'arbre (mesure de la surface terrière au niveau du greffon seulement et pas du porte greffe) est réalisée, respectivement à l'aide d'un pied à coulisse et d'un mètre-ruban forestier (ruban circonférentiel). Cette méthode de mesure est issue de la règle mise au point par Léonard De Vinci, expliquée dans ses carnets (domaine public) et vérifiée par des modèles numériques, selon laquelle « *les branches d'un arbre, à quelque hauteur que ce soit, ont, quand elles sont rassemblées, la même section que le tronc.* » (Mangin, 1999). Cette règle liée à la géométrie fractale permet de connaître la représentativité des mesures réalisées et de les rendre comparables entre elles.

5.4.2. SUIVI DES INSECTES

Cent-soixante deux relevés d'insectes (environ 10 par arbre) ont été effectués durant le printemps 2019 entre juin et juillet, immédiatement après les relevés phénologiques. La phénologie varie d'un individu à l'autre, ce qui explique la présence de relevés supplémentaires pour des arbres dont la période de floraison a été particulièrement étalée dans le temps. Afin de rendre comparable les relevés entomologiques, l'état 'Fleuri' ou 'Non Fleuri' des arbres est déterminé suite à l'exploration des données phénologiques. Les espèces d'arthropodes observées et leurs abondances respectives pour chaque « collection » (définie comme le couple Arbre_Date_julienne, par exemple : Collection A66Q_152, correspondant au suivi des insectes sur l'arbre A66Q à la date du 04/06/2019, jour julien 152) ont été rassemblées dans une base de données en prévision de ce stage.

TABLEAU 2 : ECHELLE PHENOLOGIQUE BBCH ADAPTEE AU CAS DU CHATAIGNIER.

Type de fleur	Code	Description des stades phénologiques
Châtons mâles	55	Apparition des châtons mâles
	59	Glomérules individualisés
	60	Châton de taille définitive et quelques glomérules ouverts
	61	10% des fleurs ouvertes
	62	20% des fleurs ouvertes
	63	30% des fleurs ouvertes
	64	40% des fleurs ouvertes
	65	50% des fleurs ouvertes
	67	Brunissement des châtons
69	Chute des châtons	
Inflorescences femelles	55	Apparition des inflorescences femelles
	59	Fleurs femelles bien individualisées
	60	Apparition des stigmates de la fleur centrale
	61	Stigmates centraux développés
	63	Stigmates centraux développés et apparition des stigmates des fleurs latérales
	65	Stigmates centraux et latéraux bien développés
	67	Brunissement des stigmates
	69	Inflorescence brune et stigmates flétris

TABLEAU 3 : TABLE DE CONVERSION DU CODE PHENOLOGIQUE BBCH EN POURCENTAGE DE FLEURS MATURES.

Type de fleur	Code	Flours matures	Interprétation
Châtons mâles	55	0%	Aucun châton mâle mature
	59	0%	Aucun châton mâle mature
	60	1%	Seul 1% des châtons sont matures
	61	10%	Au moins 10% des châtons produisent du pollen
	62	20%	Au moins 20% des châtons produisent du pollen
	63	30%	Au moins 30% des châtons produisent du pollen
	64	40%	Au moins 40% des châtons produisent du pollen
	65	75%	Au moins 75% des châtons produisent du pollen : Pleine floraison mâle
	67	25%	Plus que 25% des châtons produisent du pollen
69	0%	Plus aucun châton ne produit de pollen : Fin de la floraison mâle	
Inflorescences femelles	55	0%	Aucune fleur des inflorescences femelles réceptive
	59	0%	Aucune fleur des inflorescences femelles réceptive
	60	0%	Aucune fleur des inflorescences femelles réceptive
	61	10%	Au moins 10% des inflorescences sont réceptives
	63	15%	Au moins 15% des inflorescences sont réceptives
	65	75%	Au moins 75% des inflorescences sont réceptives : Pleine floraison femelle
	67	25%	Plus que 25% des inflorescences sont réceptives
	69	0%	Plus aucune inflorescence n'est réceptive : Fin de la floraison femelle

Les relevés photographiques ont été effectués en suivant activement pendant 20 minutes la partie de la canopée de l'arbre accessible à la vue. Au moins un individu a été photographié pour chaque taxon observé. L'appareil utilisé est un Nikon APS-C (D500 ou D7200) équipé d'un objectif macro de 105 mm AF-S VR Micro-Nikkor 105 mm f/2.8G, pour obtenir une image de qualité permettant l'identification. Les conditions de nébulosité, de température et les caractéristiques du vent ont été relevées pour chaque session. Dans la mesure du possible, la nébulosité était faible (<20% de nuages), la température élevée (>25°C) et le vent faible et continu plutôt que fort et irrégulier. Ce protocole est inspiré du protocole de Suivi Photographique des Insectes POLLinisateurs (SPIPOLL www.spipoll.org), créé par le Muséum d'Histoire Naturel de Paris en 2010. Il s'agit de sciences participatives faisant appel aux citoyens pour obtenir des données sur les insectes floricoles en Europe, et principalement en France (Basset, 2019). Les insectes observés et photographiés lors des suivis sur les châtaigniers ont été comparés aux collections de photographies chargées sur le site et identifiés à l'aide des clés d'identification disponibles sur la plateforme ainsi que grâce aux nombreux échanges avec d'autres chercheurs et naturalistes.

5.4.3. DONNEES

La base de données se compose de l'ensemble des collections réalisées lors du suivi : 15 collections avant floraison, 54 pendant le premier pic de floraison mâle, (codes châtons unisexués : 59 < pic 1 <67), 18 collections ont été réalisées pendant l'intervalle entre le 1^{er} et le 2nd pic mâle, 44 pendant le pic 2 (codes châtons bisexués : 59 < pic 2 <67) et enfin, 31 collections après floraison. Pour chacune de ces collections, les informations suivantes sont spécifiées : date (jj/mm/aa), espèce et variété de l'arbre, type sexuel, insectes observés, abondance des insectes de chacun des trois principaux ordres, les sous-groupes associés, l'abondances du taxon sur les fleurs femelles et les stades phénologiques des fleurs (châtons unisexués, châtons bisexués, fleurs femelles) au moment où la collection a été réalisée (TABLEAU 5 en annexe). Au total 162 collections ont été obtenues, 72 collections concernent des châtaigniers astaminés et 74 des châtaigniers staminés. Il y a 116 collections pendant la floraison et 46 hors floraison. Parmi les 116 collections effectuées pendant la floraison, 39 collections (33%) incluent des observations d'insectes sur fleurs femelles. Les observations sur fleurs femelles sont donc des événements plutôt rares. Comme 28% des collections du suivi des insectes concernent la période hors floraison, il sera possible d'identifier le caractère floricole des insectes.

Au total, 4203 insectes ont été recensés appartenant à 129 taxons d'insectes (plus d'une centaine d'espèces observées). La très grande majorité des insectes (3900 insectes, plus de 90% de l'effectif total) appartiennent à trois ordres : les Coléoptères (les plus abondants avec 2062 individus observés et 21 taxons), les Hyménoptères (1086 individus et 36 taxons) et les Diptères (752 individus, 36 taxons). Certains insectes remarquables par leur très forte abondance sont listés ci-après :

Le Téléphore fauve (*Rhagozycha fulva*) représente à lui seul 36% de la totalité des insectes observés (1500 individus) et l'espèce est représentée dans 110 des 162 collections. C'est l'insecte le plus abondant (plus que l'abeille domestique) ; il sera étudié séparément du reste des coléoptères.

L'Abeille domestique (*Apis mellifera*) est le deuxième insecte le plus abondant : 8% de l'effectif total (330 individus). C'est un pollinisateur généraliste bien connu appartenant à la famille des Apidés, dont les bourdons et les abeilles sauvages font également parti (5% de l'effectif total). En raison de leur statut particulier lié à la présence d'une espèce domestique gérée par l'homme (l'abeille domestique) et de leur rôle important comme pollinisateurs, les Apidés seront étudiés séparément du reste des hyménoptères.

Parmi les diptères les mouches Tachinaires (218 individus) sont également remarquables, ainsi qu'un autre coléoptère, la Cistèle jaune (*Cteniopus sulphureus*) (203 individus), mais ces insectes ne seront pas étudiés à part. Les groupes d'insectes étudiés seront donc : Tous les insectes, les Coléoptères, les Diptères, les Hyménoptères puis les Téléphores fauves séparément des Autres coléoptères, et les Apidés séparément des Autres hyménoptères.

5.4.4. TRAITEMENTS STATISTIQUES

Rappelons l'objectif du travail : étudier les liens entre le « sexe » des arbres et les visites des insectes pollinisateurs. Les deux premiers tests réalisés visent à évaluer deux prérequis de la pollinisation ; respectivement le caractère floricole des insectes, par leur présence sur l'arbre (sur les fleurs mâles) lorsque celui-ci est en fleur, et leur présence sur les fleurs femelles. Deux tests ont été conçus pour étudier les préférences des insectes pour les arbres en fleur (caractère floricole) et pour un type sexuel (présences ou non de pollen). Enfin la dernière étape prend en compte la phénologie, puisqu'il s'agit d'un paramètre primordial conditionnant la production de pollen par les fleurs mâles et la réceptivité des fleurs femelles.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R version x64 4.0.0, (R Development Core Team, 2005), et les graphiques ont été construits à partir des packages ggplot2, ggthemes et cowplot. Les résultats des tests statistiques sont synthétisés dans le TABLEAU 4 en annexe.

5.4.4.1. DONNEES D'ABONDANCE DES INSECTES

D'après l'analyse visuelle des quatre graphiques : *Residuals vs fitted values*, *Q-Q plot*, *Scale location plot* and *Cook's distance plot* réalisés à la suite d'un test de Shapiro-Wilk, les données sont considérées comme ne suivant pas une loi normale. De plus, elles ne sont pas indépendantes car il y a plusieurs relevés d'insectes sur chacun des 16 arbres, à des dates différentes (FIGURE 6). Entre arbres, les données d'abondance sont indépendantes.

5.4.4.2. CARACTERE FLORICOLE

Pour chaque arbre, les abondances moyennes par collection des groupes d'insectes ont été calculées, pendant et hors période de floraison. Il y a donc deux valeurs d'abondance moyenne par groupe d'insectes, une lorsque l'arbre est en fleur et l'autre lorsque l'arbre ne l'est pas. Ce pré-traitement des données permet d'effectuer un test non paramétrique des rangs : test de Wilcoxon unilatéral pour des séries appariées, `wilcox.test(x, y, alternative = "less", paired = TRUE)` (script fourni en annexe FIGURE 17). Ce test compare les abondances moyennes des collections pendant et hors floraison et indique si les insectes sont significativement plus abondants lorsque l'arbre est fleuri.

5.4.4.3. VISITE DES FLEURS FEMELLES

Chez une espèce monoïque comme le châtaignier, pour savoir si un insecte peut polliniser l'arbre et ne se contente pas de visiter les fleurs mâles en « volant » du pollen ou du nectar, il faut *a minima* vérifier que cet insecte visite également les fleurs femelles du châtaignier. Le test proposé vise à déterminer si certains insectes sont relativement plus ou moins abondants sur les fleurs femelles que sur l'arbre. Le test de la Probabilité Exacte de Fisher permet d'exploiter des données d'effectifs en tableaux de contingence, adaptés à notre jeu de données, `fisher.test(Tableau_de_contingence)` (script fourni en annexe FIGURE 18). Les données d'abondance utilisées ne concernent que les collections pendant la floraison. Il s'agit d'un tableau à doubles entrées avec l'abondance de chaque groupe d'insecte versus tous les autres insectes pour les deux échelles : fleurs femelles par rapport à l'arbre.

5.4.4.4. PREFERENCES ENTRE TYPES SEXUELS A L'ECHELLE DE L'ARBRE

La préférence des pollinisateurs pour les arbres staminés ou astaminés est examinée à l'aide d'un test de Wilcoxon bilatéral pour comparer les abondances moyennes par collection des groupes d'insectes entre les deux types sexuels des arbres. Les données ne sont plus appariées, et concernent uniquement les collections sur arbres fleuris, `wilcox.test(x, y, paired = FALSE)` (script fourni en annexe FIGURE 19).

5.4.4.5. PREFERENCES ENTRE TYPES SEXUELS A L'ECHELLE DES FLEURS FEMELLES

Un test de la Probabilité Exacte de Fisher permet de comparer les abondances des groupes d'insectes observés sur les fleurs femelles des arbres astaminés et des arbres staminés, `fisher.test(Tableau_de_contingence)`. Un tableau par groupe d'insectes est réalisé avec, pour chacun des types sexuels astaminé et staminé, le nombre de collections pour lesquelles le groupe est observé sur fleurs femelles versus le nombre de collections pour lesquelles il n'a pas été observé sur fleurs femelles. Le script est une variante du script fourni en annexe FIGURE 18, seule la ligne pour coder le nom des colonnes de la table change.

5.4.4.6. PREFERENCES ENTRE TYPES SEXUELS EN FONCTION DE L'ECHELLE D'OBSERVATION : FLEURS FEMELLES OU ARBRE ENTIER

Bien que le nombre de collections soit très différents d'une échelle à l'autre, il est possible à l'aide d'un test de la Probabilité Exacte de Fisher de comparer des effectifs en proportions entre les observations sur fleurs femelles et celles sur les arbres. De cette façon les nombres d'insectes observés sur les fleurs femelles pour les arbres astaminés versus staminés sont comparés aux nombres d'insectes observés sur les arbres entiers astaminés versus staminés. Il s'agit d'une comparaison d'abondances relatives entre deux échelles (fleurs femelles et arbre) et entre deux types sexuels. Le script est une variante du script fourni en annexe FIGURE 18, seule la ligne pour coder le nom des colonnes de la table change.

5.4.4.7. INFLUENCE DE LA PHENOLOGIE SUR LES VISITES DES FLEURS FEMELLES

D'après la littérature sur la duodichogamie des châtaigniers, trois phases sont identifiables pendant la floraison : mâle → femelle → mâle (Hasegawa *et al.*, 2017). Pour ce mémoire, trois périodes ont été distinguées sur la base de la floraison mâle. Une première période correspond à la floraison des châtons unisexués mâles (Pic 1 : codes >59 et <67), une seconde pour la floraison des châtons bisexués mâles (Pic 2 : codes >59 et <67) et une troisième

pendant l'intervalle entre le 1^{er} et le 2nd pic (Intervalle : code >67 unisexués et <59 bisexués), correspondant à la période de fin de maturité des châtons unisexués superposée à la réceptivité des fleurs femelles, les châtons bisexués ne sont pas encore fonctionnels. Pour chacune des trois phases de la phénologie, les abondances des insectes présents sur fleurs femelles sont comparées à l'aide d'un test de la Probabilité Exact de Fisher, `fisher.test(Tableau_de_contingence)`. Le script est une variante du script fourni en annexe FIGURE 18, deux lignes changent ; une lors de la construction de la table (ajout d'une ligne supplémentaire) et la seconde qui code le nom des colonnes de la table.

6. RESULTATS

6.1. PHENOLOGIE

Le suivi de chacun des individus est présenté en FIGURE 7. Il y a 2 pics distinguables : correspondant respectivement en noir à la floraison des châtons mâles unisexués (fleurs complètement ouvertes et fonctionnelles) et en gris foncé à celle des châtons mâles bisexués. Il y a une certaine variabilité entre individus, tant par la durée des périodes de réceptivité des différents types de fleurs, que par l'ordre dans lequel elles arrivent à maturité.

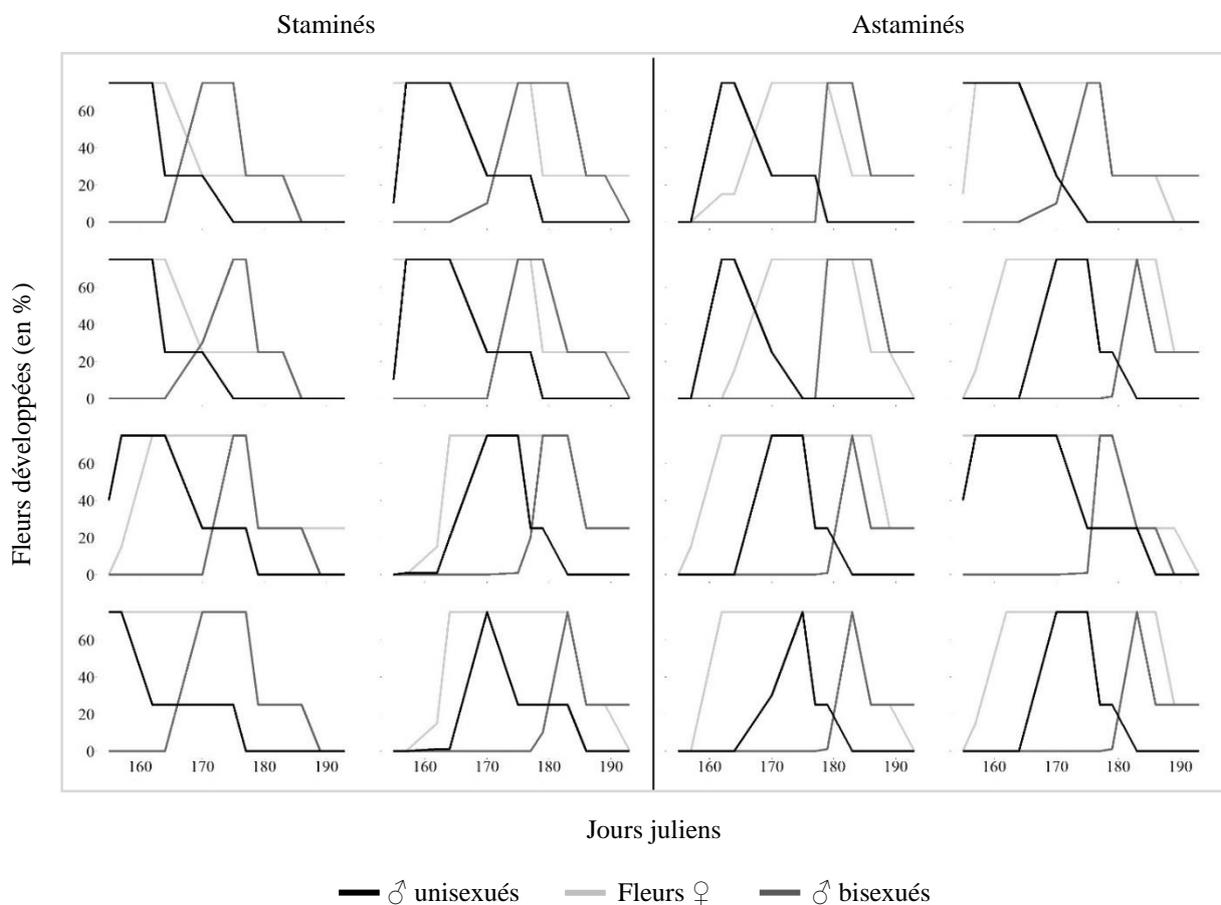


FIGURE 7 : PHENOLOGIE DES 16 CHATAIGNIERS SUIVIS EN FONCTION DU TEMPS (LARUE ET AL., 2020)

Environ dix jours séparent le début de floraison des arbres les plus précoces de celle des arbres plus tardifs. La duodichogamie décrite par Hasegawa *et al.* en 2017 ne se retrouve pas toujours, mais en moyenne les châtons unisexués sont pleinement développés environ 15 jours avant les châtons bisexués. Certains châtaigniers ont des périodes de réceptivité femelle très étalées dans

le temps (jusqu'à 3 semaines), débutant avant le premier pic de pollen et se terminant après la fin du second. Plus de 97% de la floraison mâle à lieu lors du pic 1 (Larue *et al.*, 2020), souvent en même temps que les fleurs femelles. Pendant l'intervalle entre les deux pics de floraison mâle, les fleurs femelles réceptives, initialement diluées parmi les fleurs mâles, coexistent avec les fleurs mâles fanées du pic 1 et les fleurs mâles pas encore fleuries du pic 2. Puis les dernières fleurs femelles développées coexistent avec les fleurs mâles du deuxième pic (châtons bisexués), beaucoup moins nombreuses. A noter également que pour certains arbres, des staminés notamment, le premier pic mâle n'a pas été suivi dans son entièreté. A partir de ce constat et avec la volonté de ne pas perdre d'information, les arbres ont été qualifiés de fleuri dès l'instant que le pic 1 débute (code phénologique 60) et ne le sont plus une fois le pic 2 terminé (code phénologique 67). Cela permet de conserver toutes les collections pour lesquelles l'ensemble des fleurs sont matures simultanément. Pour déterminer le caractère floricole des insectes la définition de la pleine floraison peut-être plus stricte ; du code 60 pour les unisexués au code 65 pour les bisexués (pleine floraison).

6.1.1. CARACTERE FLORICOLE

Entre les châtaigniers hors floraison et ceux en fleur, le nombre d'insectes observés sur les arbres a plus que doublé (31,1 insectes par collection contre 12,8, $p \approx 0,001$) (FIGURE 8). Les coléoptères sont trois fois plus abondants pendant la floraison (16,7 contre 5,1, $p < 0,001$) et l'effet est nettement plus visible pour le nombre de Téléphores fauves (*Rhagonycha fulva*) qui quintuple presque entre les deux stades phénologiques (16,1 contre 3,3, $p = 3.10^{-5}$). Cette espèce peut donc être à l'origine d'un effet d'entraînement sur l'effectif total (36% des insectes). Les hyménoptères sont également floricoles (8,9 contre 5,6, $p < 0,03$) avec le sous-groupe le plus remarquable par sa quasi-exclusive présence sur les arbres en fleurs : les apidés (8,1 contre 1,1, $p < 0,001$). Chez les diptères, le caractère floricole n'a pas pu être établi (5,1 contre 4,4, $p > 0,05$).

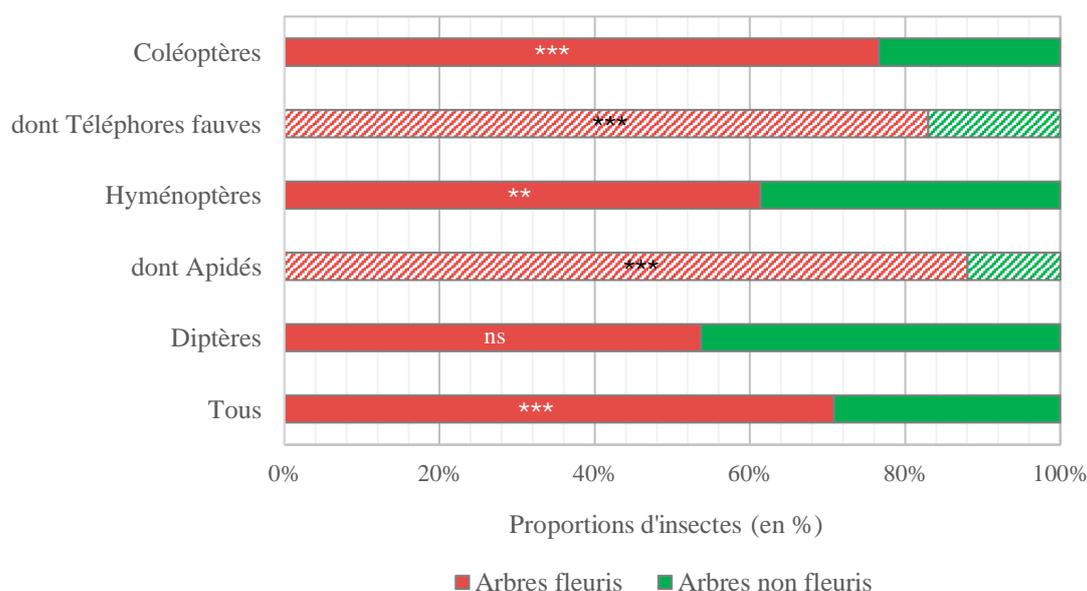


FIGURE 8 : REPARTITION DES INSECTES SUR LES CHATAIGNIERS PENDANT ET HORS FLORAISON (*** = très significatif, ** = significatif, ns = non significatif).

Le nombre moyen de taxons observés (richesse spécifique) est également plus important lorsque les châtaigniers sont en fleur (9,2 espèces par collection sur arbres fleuris contre 6,7 sur arbres non fleuris, $p \approx 0,001$).

6.1.2. VISITES DES FLEURS FEMELLES

Comme annoncé précédemment, les observations sur fleurs femelles sont un évènement rare. Seuls 66 insectes ont été observés sur ces fleurs durant la totalité du suivi (total de 32 heures et 20 minutes sur environ 6 semaines) (FIGURE 10). Cela représente 1,8% des insectes présents sur les châtaigniers pendant la floraison. Les espèces photographiées sur les fleurs femelles sont majoritairement des coléoptères (77%). Sur ces 51 coléoptères, 42 sont des téléphores fauves (*Rhagonycha fulva*) (64% des insectes sur fleurs femelles), 6 sont des coccinelles et 3 sont de grands coléoptères : 2 cistèles jaunes (*Cteniopus sulphureus*) et un lepture fauve (*Paracorymbia fulva*). Quelques diptères représentés par divers taxons de mouches (11 insectes) et quatre hyménoptères ; fourmis et abeilles dont une abeille domestique (*Apis mellifera*), composent la quinzaine d'insectes restants. Les Téléphores fauves sont surreprésentés sur les fleurs femelles ($p \approx 10^{-3}$) par rapport aux autres insectes (FIGURE 11, étape 1). Les hyménoptères sont sous-représentés sur les fleurs femelles ($p = 10^{-5}$) : Apidés ($p < 0,005$) et Autres hyménoptères ($p < 0,005$). Le test n'est pas significatif pour les autres coléoptères et les diptères ($p > 0,005$).

6.1.3. PREFERENCES ENTRE TYPES SEXUELS A L'ECHELLE DE L'ARBRE

D'après les hypothèses formulées, une préférence des insectes pollinisateurs pour les châtaigniers staminés produisant pollen et nectar est attendue (FIGURE 9 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Etonnamment, les insectes ne sont globalement pas plus abondants sur les arbres staminés que sur les arbres astaminés ($p > 0,05$), bien que la richesse spécifique soit légèrement supérieure sur les arbres staminés ($p \approx 0,04$). Ni les coléoptères, dont les Téléphores fauves, ni les diptères ne marquent de préférence pour un type sexuel ou un autre ($p > 0,05$). En revanche il y a une préférence très nette des Apidés pour les arbres staminés, c'est-à-dire produisant du pollen ($p = 6.10^{-4}$), mais pas pour les Autres hyménoptères ($p > 0,05$) (FIGURE 11, étape 2). Les Autres coléoptères préfèrent également les arbres staminés ($p < 0,05$).



FIGURE 9 : PHOTOGRAPHIES D'INSECTES SUR DES CHATONS MALES. a) Abeille domestique (*Apis mellifera*) en train de butiner sur un chaton d'arbre staminé (avec étamines) : pelotes de pollen dans les corbeilles à pollen de ses pattes arrières, b) Mouche en train de collecter le nectar de fleurs mâles d'un arbre astaminé (sans étamines) – structure hélicoïdale s'enroulant autour du chaton bien visible (PHOTOGRAPHIES : R. PETIT ET C. LARUE, 2019).



FIGURE 10 : PHOTOGRAPHIES D'INSECTES SUR FLEURS FEMELLES. a) Téléphore fauve (*Rhagonycha fulva*) perché sur une inflorescence femelle, b) Téléphore fauve léchant l'extrémité stigmatique d'un style, c) Idem pour une Cistèle jaune (*Cteniopus sulphureus*), d) Idem pour un Oedomère (*Oedomera*), e) Coccinelle adulte déambulant au milieu des styles de fleurs femelles, f) Mouche posée sur une inflorescence femelle, g) Ichneumon sur une inflorescence femelle, h) Abeille domestique (*Apis mellifera*) en train de collecter du pollen touchant accidentellement une inflorescence femelle avec son abdomen, i) Fourmi escaladant les styles de fleurs femelles (**ADAPTE DE LARUE ET AL., 2020**).

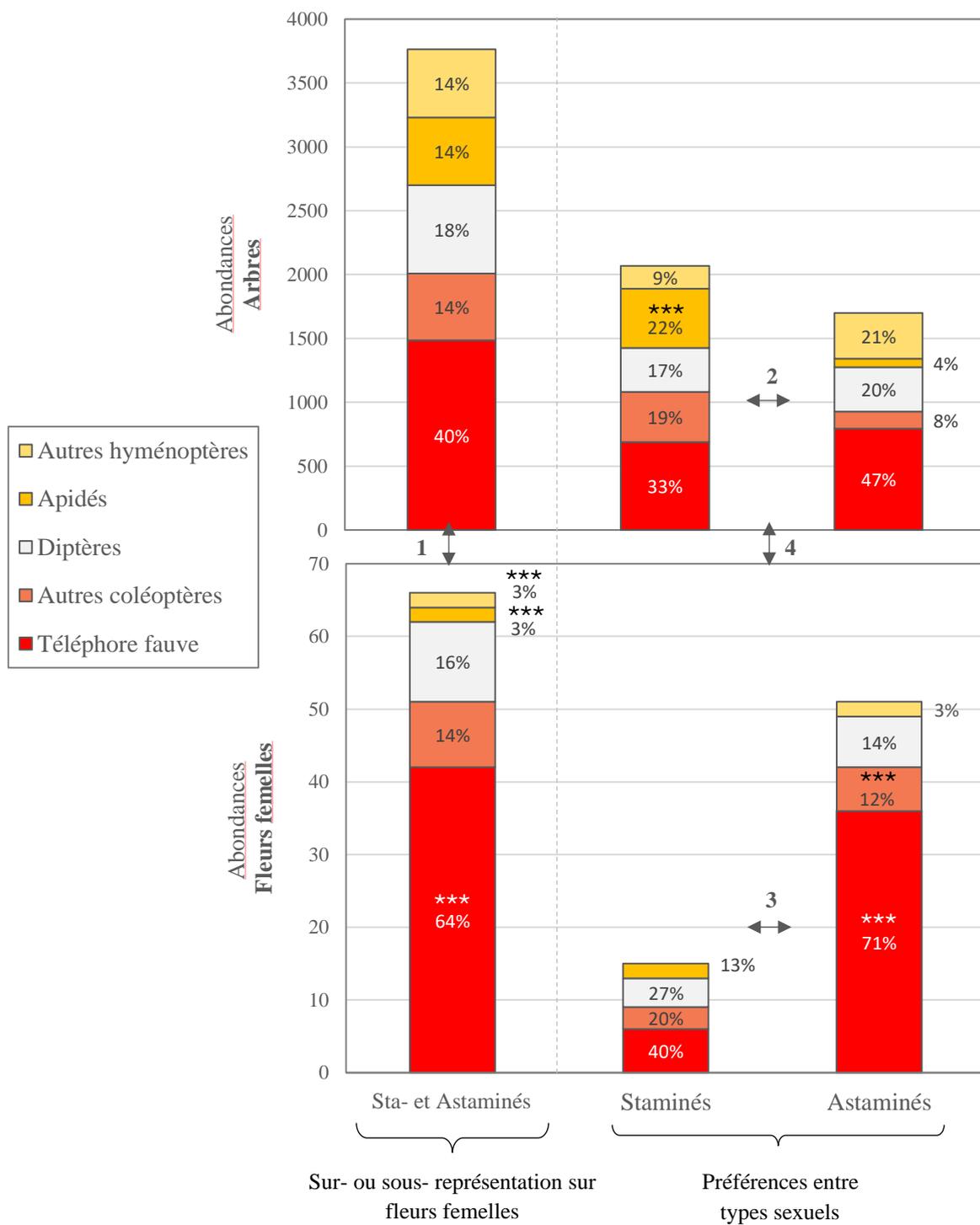


FIGURE 11 : COMPARAISON DES EFFECTIFS D'INSECTES.

- **Insectes pollinisateurs** : comparaison des effectifs sur Fleurs femelles par rapport à l'Arbre (1) ;
- **Préférences entre types sexuels** : comparaison des effectifs entre arbres staminés et astaminés (2), comparaison des effectifs sur les Fleurs Femelles entre arbres staminés et astaminés (3), puis comparaison entre staminés et astaminés au niveau des Fleurs femelles par rapport au niveau Arbre (4).

6.1.4. PREFERENCES ENTRE TYPES SEXUELS A L'ECHELLE DES FLEURS FEMELLES

Tous insectes confondus les fleurs femelles des arbres astaminés sont plus visitées que celles des arbres staminés ($p=0,015$). Toutefois, pour les diptères et les hyménoptères, peu voire pas présents sur les fleurs femelles, le test n'est pas significatif ($p>0,05$). L'effet général est donc lié à la sur-représentation du groupe des coléoptères sur les fleurs femelles des arbres astaminés ($p\approx 0,02$), elle-même liée à celle des Téléphores fauves (*Rhagonycha fulva*) ($p\approx 0,02$). Pour les autres coléoptères il n'a pas été possible de mettre en évidence une plus grande abondance sur les fleurs femelles d'un type sexuel ou d'un autre ($p>0,05$). A noter que le téléphore fauve représente 64% des insectes observés sur fleurs femelles et 71% de ceux observés sur fleurs femelles des arbres astaminés (FIGURE 11, étape 3).

6.1.5. PREFERENCES ENTRE TYPES SEXUELS EN FONCTION DE L'ECHELLE D'OBSERVATION : FLEURS FEMELLES OU ARBRE ENTIER

La comparaison des effectifs d'insectes présents sur les châtaigniers astaminés et staminés à l'échelle de l'arbre versus celle des fleurs femelles montre que les Téléphores fauves (*Rhagonycha fulva*) ($p=2.10^{-5}$) et les Autres coléoptères ($p\approx 0,01$) sont significativement sur-représentés sur les fleurs femelles des arbres astaminés (FIGURE 11, étape 4). A noter que pour ce dernier groupe il y a une inversion de la préférence ; bien que plus nombreux sur les arbres staminés, ils sont plus souvent observés sur les fleurs d'arbres astaminés. Pour les diptères non floricoles et les hyménoptères sous-représentés sur les fleurs femelles, les résultats des tests sont attendus : quand des insectes sont observés sur les fleurs femelles, il n'y a pas de différence significative entre leurs abondances sur fleurs femelles des arbres astaminés ou staminés ($p>0,05$).

6.1.6. INFLUENCE DE LA PHENOLOGIE SUR LES VISITES DES FLEURS FEMELLES

Pendant la floraison des arbres, il y a environ 4000 fleurs mâles pour une fleur femelle (Larue *et al.*, 2020). De plus, seules les fleurs mâles attirent les insectes pollinisateurs à la recherche de pollen ou de nectar (Flacher *et al.*, 2017 ; Albouy, 2018, Ruedenauer, 2019 ; Dellinger, 2020). Les fleurs femelles produisent uniquement une très petite quantité de substance sucrée aux extrémités de leurs styles, s'apparentant au nectar (Porsch, 1950), et pas de pollen. Les visites d'insectes selon les stades phénologiques sont visualisés sur arbres entiers et sur fleurs femelles (FIGURE 12 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). En se plaçant à l'échelle de l'arbre, contrairement aux suppositions précédentes, le nombre de visites d'insectes pendant le pic 1 n'est maximal que pour les Téléphores fauves (*Rhagonycha fulva*) et dans une bien moindre mesure pour les diptères. Les Autres coléoptères et Apidés sont les plus présents durant l'intervalle entre les deux pics mâles, tandis que les Autres hyménoptères sont les plus abondants après floraison. L'abondance des Apidés est élevée au début de la période de floraison (Pic 1 et Intervalle) et chute considérablement en dehors de ces phases (conformément aux résultats du test floricole). Pour les diptères, non ou peu floricoles, il y a une certaine constance dans le nombre d'insectes par collection au cours du temps (min : 3,8 Avant floraison – max : 5,4 Pic 1). En considérant maintenant les fleurs femelles, il n'y a logiquement aucun insecte présent avant la floraison et peu pendant le pic 1 et après floraison. L'essentiel des visites se concentre durant l'intervalle et pendant le pic 2 pour les diptères (test non significatif $p>0,05$) et coléoptères ($p=4.10^{-8}$). Les Téléphores fauves (*Rhagonycha fulva*) sont surreprésentées sur

fleurs femelles durant l'intervalle et massivement pendant le pic 2 ($p=1.10^{-9}$). Les hyménoptères sont quasiment absents des fleurs femelles tout au long de la période de floraison ($p>0,05$), et plus particulièrement les Apidés avec un nombre de visites nul au moment des phases d'affluence : intervalle et pic 2 ($p>0,05$). Ces résultats rendent compte de la variabilité qui existe entre les échelles d'observation.

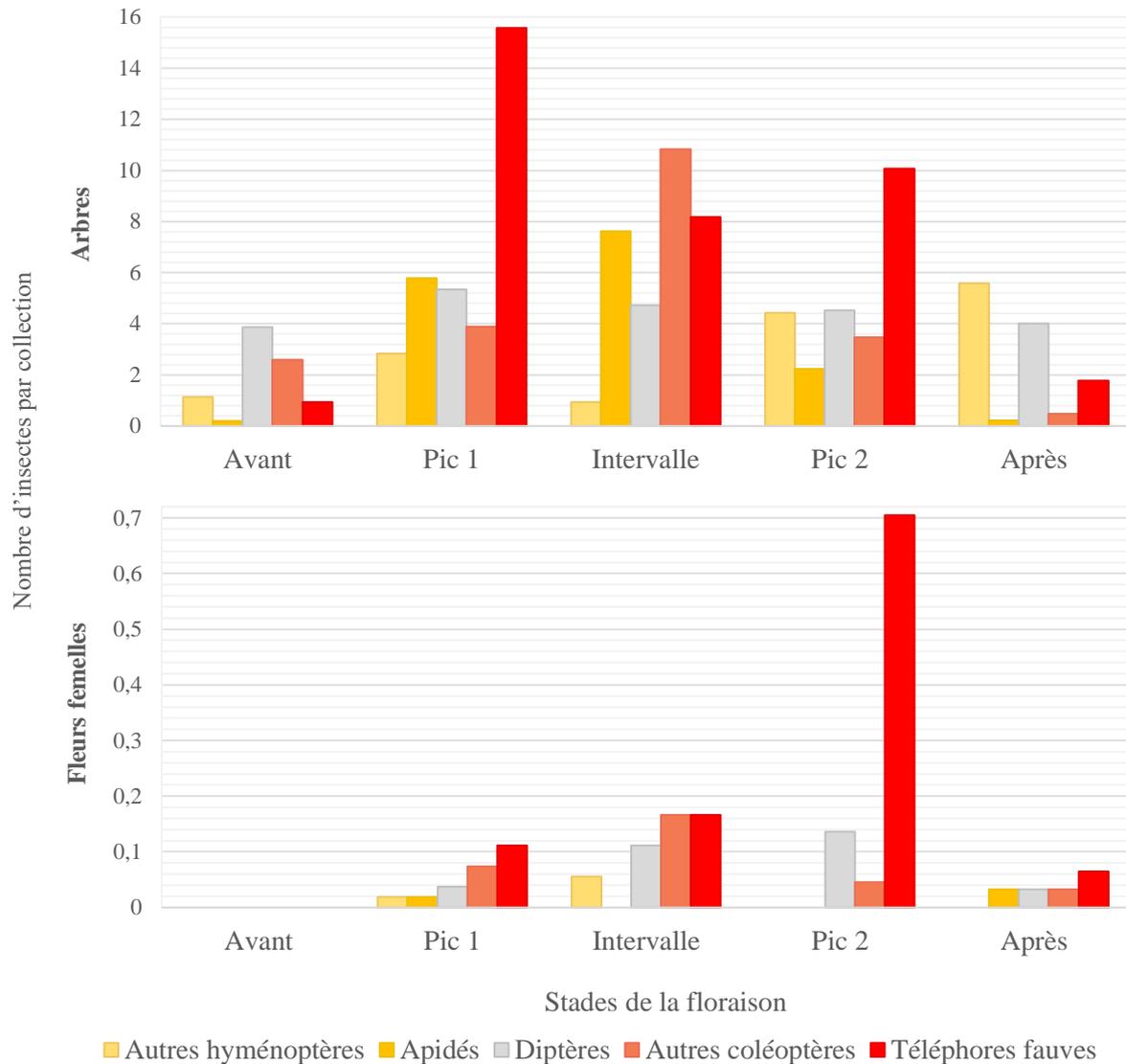


FIGURE 12 : VISITES DES INSECTES A L'ECHELLE DE L'ARBRE ENTIER ET DES FLEURS FEMELLES EN FONCTION DES STADES PHENOLOGIQUE DES CHATAIGNIERS A LA FLORAISON (ADAPTE D'APRES LARUE ET AL., 2020).

7. DISCUSSION

Les résultats montrent que durant la floraison, les arbres astaminés sont négligés par un certain nombre d'insectes, dont les Apidés qui sont sur-représentés sur les arbres staminés produisant du pollen. Certains coléoptères – exception faite du Téléphore fauve (*Rhagonycha fulva*) – montrent également une préférence pour ces arbres staminés. Le pollen serait donc une récompense majeure pour les insectes visiteurs du châtaignier. Les abeilles, par exemple, bien qu'ayant déjà été observées en train de collecter du nectar sur les châtaigniers (Giovanetti et Aronne, 2011), sont totalement absentes des astaminés ne produisant que du nectar. Ceci indique que la production de pollen est déterminante pour les visites des arbres. Lorsque le succès de la pollinisation est étudié grâce au comptage du nombre de fruits développés par bogue après la floraison, il n'en résulte pas un nombre de châtaignes inférieur pour les arbres astaminés, bien au contraire (Larue *et al.*, 2020). En effet, il y a plus de fruits développés par bogue pour les astaminés que les staminés du même verger. Attention, il ne s'agit pas du rendement mais de l'expression d'une de ces composantes. Cette préférence pour les fleurs femelles des arbres astaminés pourrait donc contribuer à ce meilleur succès de pollinisation

Les résultats montrent également très nettement la domination des coléoptères par rapport aux autres insectes (52% du total), avec plus particulièrement la sur-représentation du Téléphore fauve (*Rhagonycha fulva*). Certaines observations laissent penser qu'il existe une interaction spécifique entre le châtaignier et le Téléphore fauve (*Rhagonycha fulva*) car cette espèce a presque toujours été observée en train de copuler : la femelle s'alimentant sur les fleurs pendant que le mâle est sur son dos (FIGURE 13). Ce comportement suggère que le châtaignier pourrait être un lieu de « rendez-vous » pour la reproduction du Téléphore fauve (Faegri et van der Pilj, 1979). Une autre étude a mis en évidence que 50 à 60% des visites d'insectes sur les châtaigniers en fleur étaient réalisées par des coléoptères (Porsch, 1950). D'après ces éléments, le châtaignier qui est une espèce entomophile pourrait être plus spécifiquement cantharophile, c'est-à-dire principalement pollinisée par les coléoptères (Larue *et al.*, 2020). Cette hypothèse est à vérifier par des recherches plus approfondies pour prouver que ce sont bien des coléoptères qui amènent le pollen pour la fécondation des ovules, à l'origine des châtaignes.

Avant ce travail, la réalité de la visite des fleurs femelles restait à établir, d'autant qu'elles étaient perçues comme étant *a priori* très peu attractives pour les insectes pollinisateurs (Larue *et al.*, 2020). Par exemple, Johnson (1988), Giovanetti et Aronne (2011) et plus récemment Zirkle (2017), expliquent qu'ils n'ont pas pu détecter la présence d'insectes sur les fleurs femelles ou alors une visite isolée semblant accidentelle. Porsch (1950) est le seul à avoir suggéré un mécanisme d'attraction des insectes par les fleurs femelles via de petites sécrétions aux extrémités des stigmates, pouvant représenter une récompense pour les pollinisateurs. Dans ce travail, pour la première fois, un nombre conséquent de visites de fleurs femelles ont été répertoriées (66), même si cela ne représente qu'environ 2% du total des visites comptabilisées sur les arbres. Ces observations montrent que la pollinisation des fleurs du châtaignier est possible. D'après les observations de terrain, plusieurs insectes sont vu perchés ou en train de marcher sur les styles des fleurs femelles, touchant les extrémités où se trouvent les stigmates. Parfois même, les insectes se servent de la brosse de styles comme d'une plateforme d'atterrissage ou de décollage, notamment le Téléphore fauve (*Rhagonycha fulva*) (FIGURE 14).



FIGURE 13 : COUPLES DE TELEPHORES FAUVES (*RHAGONYCHA FULVA*) SUR DES CHATONS MALES DE CHATAIGNIERS. a) Accouplement de Téléphores fauves sur un châton mâle astaminé : la femelle se nourissant du nectar pendant que le mâle est sur son dos, b) Trio de Téléphores fauves sur un châton astaminé, c) Couple sur un châton staminé (PHOTOGRAPHIES LARUE ET AL, 2020).

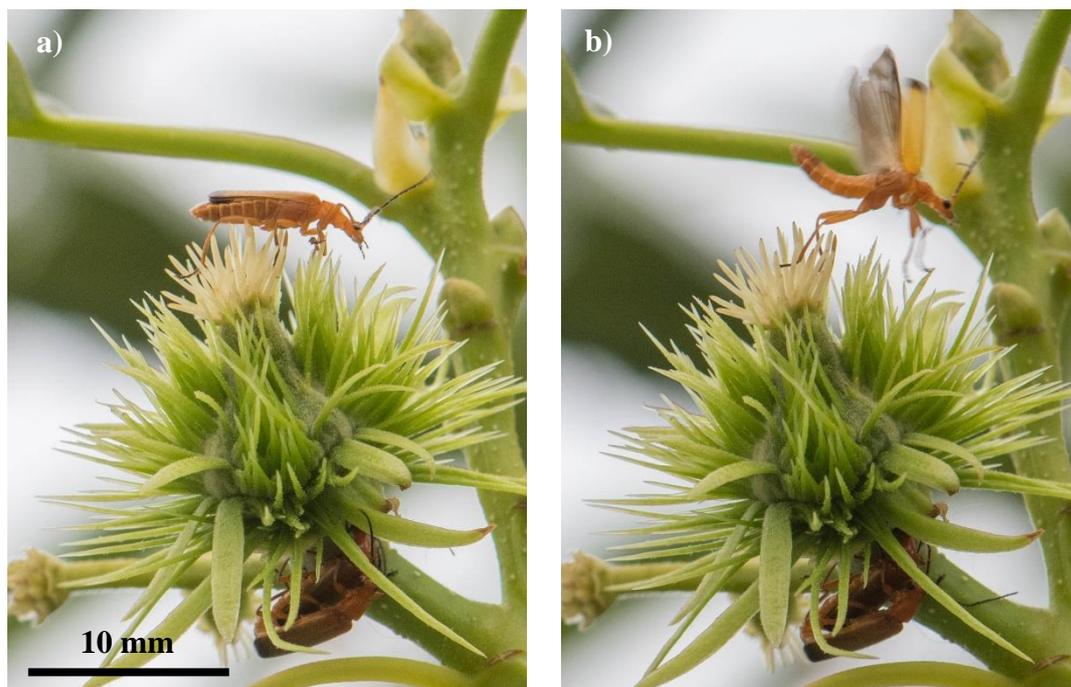


FIGURE 14 : TELEPHORE FAUVE (*RHAGONYCHA FULVA*) PERCHE SUR UNE INFLORESCENCE FEMELLE. a) avec un couple de Téléphores fauves en train de s'accoupler sous la bractée de l'inflorescence femelle, b) Téléphore fauve prenant son envol (LARUE ET AL., 2020).

La biologie et la phénologie florale du châtaignier en font un modèle d'étude tout à fait original permettant d'étudier notamment la sélectivité des pollinisateurs pour chaque type de fleur. Cette sélectivité pour un type de fleurs peut avoir des conséquences importantes en terme d'évolution de l'espèce, en favorisant l'évolution de certains caractères floraux femelles vers une imitation de l'apparence des fleurs mâles (Willson et Ågren, 1989). A l'échelle des fleurs femelles, les coléoptères – et particulièrement le Téléphore fauve (*Rhagonycha fulva*) – sont plus abondants sur arbres astaminés que sur arbres staminés (82% : 51 observations de coléoptères sur les 66 totales, 42 sur astaminés contre 9 sur staminés). La morphologie des fleurs femelles avec leurs styles blanc érigés rappelle beaucoup celles des fleurs mâles en forme et en couleur (FIGURE 15 a)). L'organisation de l'inflorescence en un regroupement de trois fleurs femelles crée une brosse de filaments blanchâtres ressemblant à une touffe d'étamines à la base d'un châton mâle. Sur le verger, un cas de châton entièrement recouvert de fleurs femelles a été trouvé (FIGURE 15 c)), mettant encore plus en évidence la forte ressemblance des deux types de fleurs.

Tous ces éléments suggèrent un automimétisme au sein de l'espèce, les fleurs femelles semblant « imiter » les fleurs mâles pour attirer les insectes pollinisateurs à la recherche de pollen et de nectar – récompenses fournies par les seules fleurs mâles (Willson et Ågren, 1989). Cette idée est étayée par plusieurs arguments. Tout d'abord, le modèle du châtaignier vérifie un prérequis indispensable au fonctionnement des mécanismes mimétiques : la rareté relative de l'imitation par rapport à son modèle. En effet le nombre de fleurs mâles est très supérieur à celui des fleurs femelles – ratio dépassant 3900 fleurs mâles pour 1 fleur femelle en pleine floraison (Larue *et al.*, 2020). De plus, chez les arbres astaminés, les seules fleurs ressemblant à des fleurs staminées sont les fleurs femelles. Or les fleurs femelles des arbres astaminés sont plus visitées que celles des arbres staminés, suggérant que les insectes recherchent des fleurs ayant une apparence staminée et que les visites des fleurs femelles dépendent du contexte local et notamment de l'abondance des imitations (les fleurs femelles) par rapport au modèle (les fleurs staminées).

La duodichogamie des châtaigniers semble aussi jouer un rôle majeur dans l'efficacité de l'automimétisme. L'exposition massive des fleurs mâles des châtons unisexués, chargées de pollen ou de nectar, constitue le signal de « départ » de la floraison et initie l'attraction de nombreux insectes. Il faut d'ailleurs remarquer un certain délai entre ce premier pic de floraison et la forte augmentation des abondances d'insectes qui sont maximales lors de la phase suivante. Dans un second temps, une fois les principaux vecteurs présents autour des arbres, les fleurs femelles réceptives sont rendues plus « apparentes » car les châtons mâles unisexués commencent à faner et les fleurs mâles des châtons bisexués n'ont pas encore commencé à fleurir. A ce moment, lors de l'intervalle, il semblerait que les fleurs femelles « tirent profit » de l'absence d'autres fleurs et que les pollinisateurs « soient bernés » par leur apparence trompeuse. Enfin, les fleurs des châtons mâles bisexués éclosent à leur tour, offrant à nouveau les récompenses convoitées par les pollinisateurs, et les attirant à proximité des fleurs femelles encore réceptives situées à leur base. D'après McKay, 1972, l'existence de châtons bisexués est un fort argument en faveur de la pollinisation entomophile du châtaignier car ils semblent « être un dispositif fait pour attirer les insectes d'autres arbres vers l'arbre en question au moment où les fleurs femelles sont réceptives ».

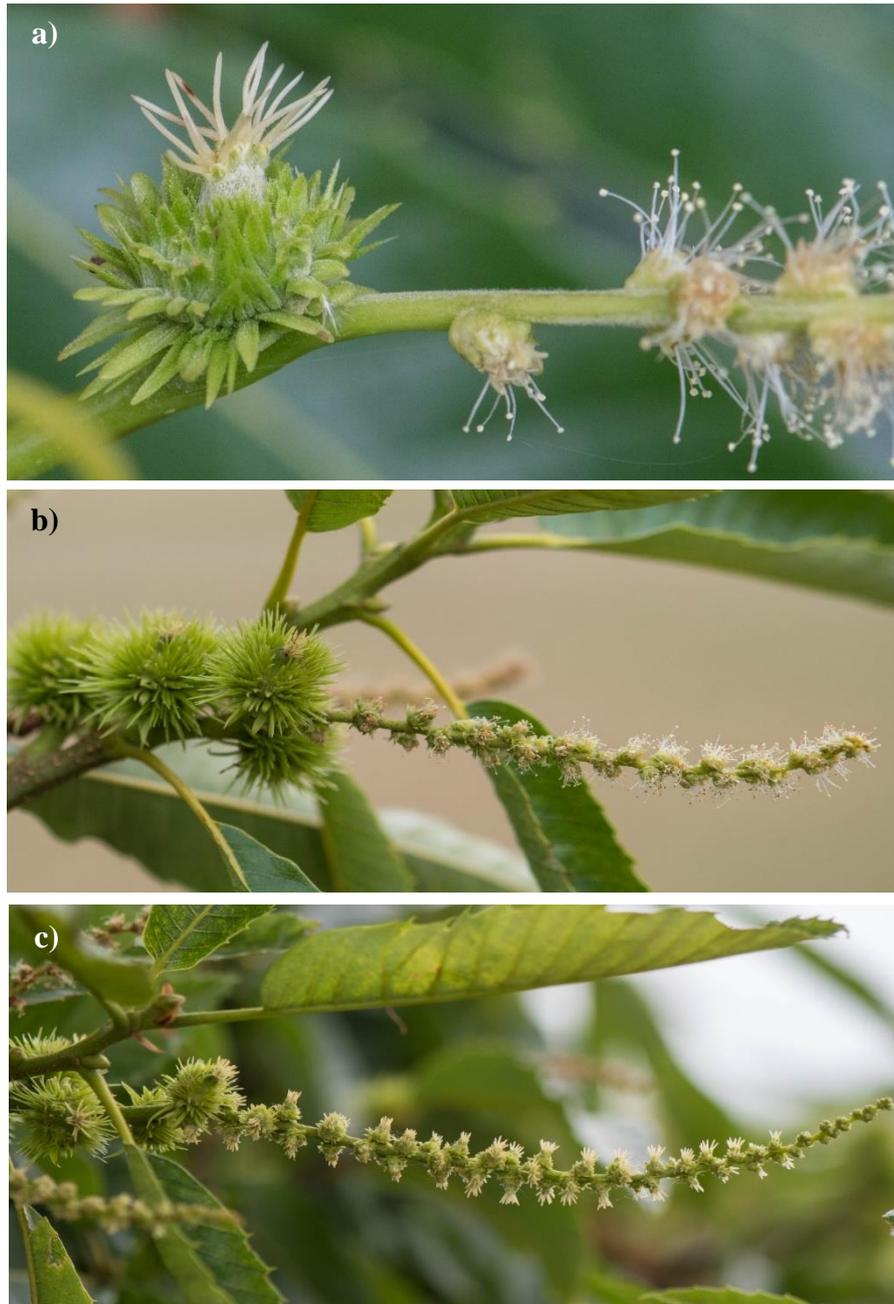


FIGURE 15 : ILLUSTRATION DE L'AUTOMIMÉTISME. a) Fleur femelle réceptive à la base d'un châton mâle bisexué. A noter qu'il y a une grande ressemblance entre les fleurs au niveau des styles et étamines : courts, blancs, érigés, et regroupés, b) Châton mâle bisexué avec quelques fleurs femelles à sa base et des fleurs mâles aux étamines érigées, c) Châton bisexué anormal (cas rare) avec à la place de fleurs mâles le long du châton, des fleurs femelles aux styles blancs en brosse. La ressemblance entre les deux châtons est remarquable par l'aspect des styles, de même couleur, taille, forme, et aspect groupé que les étamines. (ADAPTE DE LARUE ET AL., 2020).

Bien que très nombreux sur fleurs mâles, et notamment sur fleurs mâles fertiles (arbres staminés), les insectes de la famille des Apidés sont très peu, voire pas, observés sur les fleurs femelles. Ce phénomène a également été relevé par Giovanetti et Aronne en 2011 qui constatent que les abeilles évitent les fleurs femelles. Pourtant, les abeilles domestiques (*Apis mellifera*) sont à elles seules la seconde espèce la plus abondante sur les châtaigniers. L'unique

observation d'une abeille domestique sur ces fleurs était clairement un contact accidentel de son abdomen pendant que celle-ci butinait les fleurs mâles les plus proches. Une telle différence avec le comportement des coléoptères peut être attribuée à leur mode de déplacement : les coléoptères marchants et déambulant sur un arbre avant de s'envoler pour un autre, les Apidés volants de fleur en fleur en se posant avec précision sur leurs cibles. Une autre explication pourrait être la meilleure capacité des abeilles à distinguer les deux types de fleurs mâle et femelle comme cela est le cas dans d'autres systèmes mimétiques (Dukas, 1987).

La distance séparant les fleurs femelles du premier glomérule des châtons bisexués mâles se nomme herkogamie (ou herchogamie). D'après les observations précédentes, l'étude plus approfondie et quantitative de ce caractère semble pertinente (Larue *et al.*, 2020) et à mettre en lien avec le succès de la pollinisation dont un proxy est le taux de remplissage des bogues évoqué plus tôt (nombre de châtaignes développées par bogues), complété par le nombre de fleurs donnant des bogues.

8. PERSPECTIVES

En perspective de ce travail il est possible d'envisager poursuivre plus loin la recherche sur la pollinisation des châtaigniers en explorant les charges en pollen présentes sur le corps des insectes. Il existe une technique innovante qui utilise le *DNA metabarcoding* : séquençage et identification d'ADN d'un mélange d'échantillons en utilisant du séquençage haut débit (HTS ou NGS next-generation sequencing) pour séquencer de très importantes quantités de fragments d'ADN simultanément (Lucas *et al.*, 2018). Cette technique initialement utilisée pour déterminer la composition des communautés d'invertébrés et examiner la structure des réseaux trophiques, offre aussi un grand potentiel pour l'étude du transport de pollen d'arbre en arbre en plus d'une bonne fiabilité (Lucas *et al.*, 2018). L'application de cette méthode nécessite la capture d'un certain nombre d'insectes. Vu son abondance, le Téléphore fauve (*Rhagozycha fulva*) est le candidat idéal pour appliquer cette technique nouvelle et réussir à déterminer quels châtaigniers (préalablement génotypés) les insectes ont visité avant leur capture sur un arbre donné. Cela permettrait d'étudier les flux de pollen. Ces données pourront aussi être mises en relation avec les succès reproducteurs mâles déterminés par analyses de paternité à partir des fruits.

Les applications pratiques découlant de l'approfondissement de ces recherches concerneront la conception des vergers : diversification variétale, arbres astaminés et staminés, alignements hétérogènes, etc... En effet, ce travail pourrait permettre d'identifier des arbres « bons donneurs de pollen » (staminés). Ces individus identifiés par leurs caractéristiques génotypiques (par exemple espèce et variété) pourront être intégrés dans les vergers afin d'assurer une bonne disponibilité en pollen. De nos jours, une grande majorité des variétés cultivées en Europe et dans le monde sont des châtaigniers astaminés (Martin *et al.*, 2017) qui ne produisent donc pas de pollen. Cela souligne la nécessité de disposer de suffisamment d'arbres donneurs de pollen. Dans certains vergers peu diversifiés, il est possible que ce problème de faible nombre de donneurs de pollen soit masqué par la présence de châtaigniers sauvages aux alentours, mettant en évidence les services offerts par des écosystèmes naturels ou semi-naturels. Toutefois, ce rôle des donneurs de pollen sauvages reste à confirmer et dans de nombreux cas ils seront trop éloignés pour compenser un mauvais design du verger. Ainsi, en parallèle de l'incitation à la

mise en place de mesures agroécologiques comme proposées ci-dessus et de la sensibilisation des professionnels à la valorisation et à la protection de leur territoire, dont ils sont des acteurs majeurs, il convient d'insister sur le rôle fondamental de la diversité génétique au sein des vergers, souvent malmenée par la tentation de l'uniformité génétique qui facilite la mécanisation.

9. CONCLUSION

Le travail fourni pour ce mémoire est novateur en raison du grand nombre de relevés d'insectes réalisés et particulièrement les relevés sur les fleurs femelles des châtaigniers. L'importance des effectifs permet de répondre à la problématique posée en amont concernant l'influence des caractéristiques liées à la reproduction sur les visites des insectes pollinisateurs du châtaignier. Le type sexuel des arbres est un caractère déterminant en raison de la production de récompenses recherchées des pollinisateurs : pollen et nectar pour les arbres staminés (bisexués), ou juste nectar pour les arbres astaminés (mâles-stériles). La grande majorité des insectes préfèrent les arbres staminés, et particulièrement les apidés qui visitent quasi-exclusivement ces derniers. Pourtant les fleurs femelles les plus visitées sont celles des arbres astaminés ne produisant pas de pollen. La piste envisagée pour expliquer ces résultats est la remarquable ressemblance entre fleurs mâles et femelles qui suggère un automimétisme des fleurs mâles par les fleurs femelles, notamment en raison de la rareté relative de l'imitation (fleurs femelles) par rapport à son modèle (fleurs mâles). Toutefois, le pollinisateur généraliste le plus connu, et également second insecte le plus observé lors de cette étude ; l'abeille domestique, ne s'intéresse pas à ces fleurs femelles et ne les touche qu'accidentellement. Les coléoptères, qui sont les plus représentés sur les châtaigniers, visitent aussi bien les fleurs femelles des arbres astaminés que staminés et plus particulièrement un grand coléoptère, le Téléphore fauve (*Rhagozycha fulva*). C'est l'insecte le plus présent sur les châtaigniers. Les observations de terrain et les résultats statistiques laissent penser que le châtaignier est une espèce cantharophile, c'est-à-dire principalement pollinisée par les coléoptères.

Ainsi, l'installation de ruches dans les châtaigneraies ne semble pas une mesure indiquée. En effet, contrairement à l'idée très répandue, l'abeille domestique (*Apis mellifera*) n'est pas toujours un pollinisateur efficace de toutes les espèces angiospermes et ne semble pas l'être pour le cas du châtaignier. Les « *non-bee insects* » (insectes non-abeille), tels qu'ils sont qualifiés par Rader *et al.* (2020), ont un rôle majeur dans la pollinisation de nombreuses cultures. En revanche, l'installation de refuges à insectes sur le verger pourrait être recommandée, par exemple en laissant quelques tas de bois et de la litière de feuilles, habitats du Téléphore fauve (*Rhagozycha fulva*) (Cassar, 2015 ; Larue *et al.*, 2020.). De même, pour attirer et conserver d'importants effectifs d'insectes pollinisateurs à proximité des arbres pendant leur floraison, réaliser une fauche tardive de la strate herbacée du verger permet de laisser les fleurs sauvages fleurir – à des périodes de floraison variées – et contribue à conserver une ressource alimentaire pour les insectes, pendant et hors floraison du châtaignier. Ainsi, même entre des arbres à la phénologie très décalée, plus tardive par exemple, des insectes pollinisateurs restent présents sur le verger pour assurer leur pollinisation. Afin d'aider financièrement les castanéculteurs et de les accompagner dans ces changements de pratiques, les nouvelles pratiques préconisées pourraient s'inscrire dans le cadre des mesures agro-

environnementales et climatiques (MAEC) avec le développement des services écosystémiques rendu par les pollinisateurs sauvages et la préservation de la biodiversité (microfaune, entomofaune et flore). Enfin, une mesure phare qui suit les réglementations en vigueur dans le cadre du plan ECOPHYTO (V2+) (informations disponibles sur le site du ministère de l'agriculture et de l'alimentation : <https://agriculture.gouv.fr/ecophyto> ou sur le site <https://ecophytopic.fr>) est la réduction ou l'arrêt de l'utilisation de pesticides ; plus spécifiquement des insecticides généraux qui touchent un large spectre d'insectes. Il convient que les castanéculteurs favorisent l'usage de produits spécifiques du(des) ravageur(s) cible(s) si possible et seulement en dernier recours.

10. LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

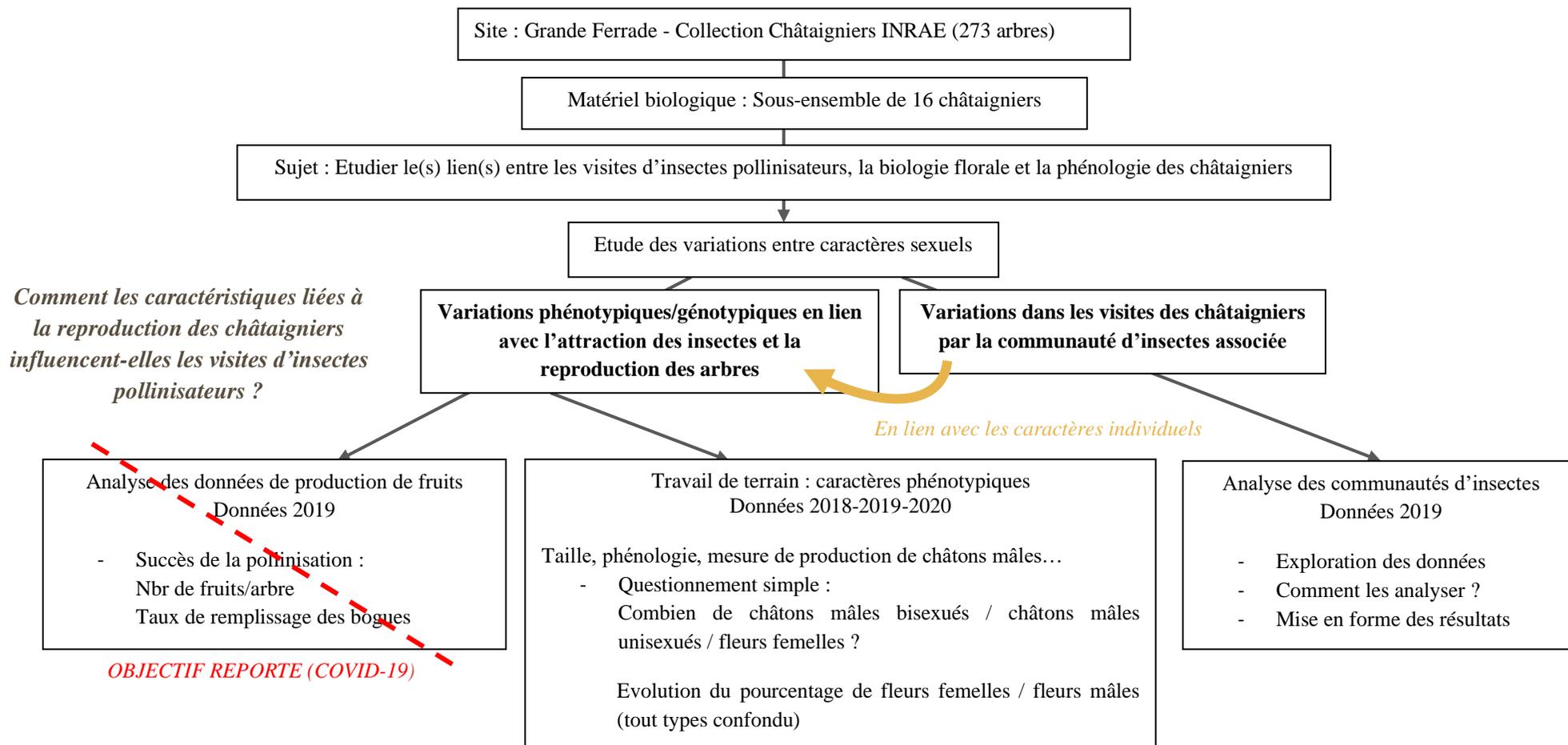
- Albouy V., 2018. Pollinisation : le génie de la nature. Editions Quae. Versailles, France. 183 p.
- Basset, G., 2019. Etude des communautés d'insectes floricoles. Exemple de la pollinisation du châtaignier, *Castanea sativa*. Rapport de stage de master 1. Sciences Fondamentales et Appliquées. Poitiers : Université de Poitiers. 24 p.
- Brown, J.H., Marquet, P.A., Taper, M.L., 1993. Evolution of body size: consequences of an energetic definition of fitness. *The American Naturalist* 142(4), pp. 573-584. DOI 10.1086/285558.
- Bruneton-Governatori, A. 1984. Le pain de bois, éthnohistoire de la châtaigne et du châtaignier. Edition Eché. Toulouse.
- Cassar, T., 2015. *Rhagonycha fulva* (Scopoli), a new record of soldier beetle (Coleoptera, Cantharidae) from Malta. *Bull. Ent. SOC*, 2015. 7, p 148. DOI 10.17387/BULLENTSOCMALTA.2015.15
- Chapa, J., 1984. Pollinisation du châtaignier. Dans : Pollinisation et production végétales. INRA. Paris. 1984. pp. 187-194
- Charlesworth, D., 2002. Plant sex determination and sex chromosomes, Nature Publishing Group, *Heredity*. 2002. 88, pp.94–101. DOI 10.1038/sj/hdy/6800016
- Crepet, W.L., Niklas, K.J., 2009. Darwin's second "abominable mystery": why are there so many angiosperm species? *American Journal Of Botany*, 2009. 96(1), pp. 366-381 DOI 10.3732/ajb.0800126
- Dawkins, R., 1989. *The Selfish Gene*: Oxford University Press, p. 286. D'après Méthot, P.O., 2008. Du gène égoïste à la physiologie du phénotype étendu : vers une redéfinition des frontières de l'individualité biologique. Thèse de doctorat en philosophie à l'Université de Montréal, Faculté des arts et des sciences dans le cadre de l'obtention du grade de maîtrise. Montréal, Canada. p. 31.
- Deguines N., Jono C., Baude M., Henry M., Julliard R., Fontaine C., 2014. Large-scale trade-off between agricultural intensification and crop pollination services. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 2014. 12 (4), p. 212-217.
- Dellinger, A.S., 2020. Pollination syndromes in the 21st century: where do we stand and where may we go? *New Phytologist*. 2020. Tansley review, p.21. DOI 10.1111/nph.16793
- De Oliveira, Gomes, Ilharco, Manteigas, Pinto et Ramalho, 2001. Importance of Insect Pollinators for the Production in the Chestnut, *Castanea sativa*. *Acta Horticulture*. 2001. n° 561, pp. 269-273.
- Dufaÿ, M. et Billard, E., 2011. How much better are females? The occurrence of female advantage, its proximal causes and its variation within and among gynodioecious species. *Annals of Botany*. 2011. n° 109, pp. 505-519. DOI 10.1093/aob/mcr062
- Dufaÿ, M., Champelovier, P., Käfer, J., Henry, J.-P., Mousset, S., Marais, G.A.B., 2014. An angiosperm-wide analysis of the gynodioecy–dioecy pathway. *Annals of Botany*. 2014. n° 114, pp. 539-548. DOI 10.1093/aob/mcu134
- Dukas, R., 1987. Foraging behavior of three bee species in a natural mimicry system: female flowers which mimic male flowers in *Ecballium elaterium* (Cucurbitaceae). *Oecologia*, 74(2), pp. 256–263.
- Faegri, K., et Van der Pijl, L., 1979. *The principles of pollination ecology*. Elsevier. 3rd edn. Pergamom.
- Feijó, J.A., Certal, A.C., Boavida, L., Van Nerum, I., Valdivieso, T., Oliveira, M.M., Broothaerts, W., 1999. Advances on the study of sexual reproduction in the cork-tree (*Quercus suber* L.), chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and in Rosaceae (apple and almond). Springer, Berlin, Heidelberg. *Fertilization in Higher Plants*, 1999. pp. 377-396.
- Flacher, F., Hansart, A., Motard, E., Fofana, A.M., Vincent, O., Geslin, B., Dajoz, I., Raynaud, X., 2017. Does competition with wind-pollinated species alter *Echium plantagineum*'s attractiveness to a common pollinator *Bombus terrestris*? *Ecological Entomology*, 2017. 42(5), pp. 617-628. DOI 10.1111/een.12426
- Giovanetti, M. and Aronne, G., 2011. Honey bee interest in flowers with anemophilous characteristics: first notes on handling time and routine on *Fraxinus ornus* and *Castanea sativa*. *Bulletin of Insectology*, 64(1), pp. 77–82.
- Groom, P., 1909. *Trees and their life histories*. Cassell, London. 1909. pp. 180-187.
- Groupeement Régional des Producteurs et Transformateurs de Châtaignes et de Marrons Corse (GRPTCMC), 2010. Biologie florale du châtaignier. Fiche technique. Chambres d'Agriculture de Haute-Corse et de Corse du Sud. Corse, France., 3 p.

- Harder, L.D., Wilson, W.G., 1997. Theoretical perspectives on pollination. [D'après une conférence : Seventh international symposium on pollination, Pollination: from theory to practise. Lethbridge, Canada, 1996]. Eds : Richards, K.W., Acta Horticulturae, 1997. (437), pp. 83-101. DOI 10.17660/ActaHortic.1997.437.7
- Hasegawa, Y., Suyama, Y., Seiwa, K., 2015. Variation in Pollen-Donor Composition among Pollinators in an Entomophilous Tree Species, *Castanea crenata*, Revealed by Single-Pollen Genotyping. PLoS ONE 10(3): e0120393. DOI 10.1371/journal.pone.0120393
- Hasegawa, Y., Suyama, Y., Seiwa, K., 2017. Flowering phenology of a duodichogamous self-incompatible tree species, *Castanea crenata*. Japanese Journal of Ecology, 2017. 67(1), pp. 31-39
- Johnson, G.P., 1988. Revision of *Castanea* sect *Balanocastanon* (Fagaceae). Journal of the Arnold Arboretum, 69(1), pp. 25-49.
- Larue, C., Austruy, E., Basset, G., Petit, R.J., 2020. Revisiting pollination mode in chestnut: an integrated approach. Botany Letters, à paraître. pp. 2-36.
- Leonard, J.L., 2013. Williams' paradox and the role of phenotypic plasticity in sexual systems, Integrative and Comparative Biology, 2013. 53(4), pp. 671-688, DOI 10.1093/icb/ict088
- Lucas, A., Bodger, O., Brosi, B.J., Ford, C.R., Forman, D.W., Greig, C., Hegarty, M., Jones, L., Neyland, P.J., de Vere, N., 2018. Floral resource partitioning by individuals within generalised hoverfly pollination networks revealed by DNA metabarcoding. Scientific Reports, 2018. 8, p 5133. DOI:10.1038/s41598-018-23103-0
- McKay, J.W., 1972. Pollination of chestnut by honey bees. Northern Nut Growers Ass Annu Rep, (63), pp. 83-86.
- Mangin, L., 1999. Léonard et la formule de l'arbre : Léonard de Vinci avait identifié une règle portant sur les diamètres des branches d'un arbre. Des modèles numériques la valident et montrent qu'elle correspond à la meilleure résistance au vent. Dans : Pour la science, n° 411. [en ligne]. 30 novembre 1999. [Consulté le 05 juin 2020].
- Manicacci, D., 1993. Evolution et maintien de la gynodioécie : allocation sexuelle et structuration spatiale du polymorphisme nucléo-cytoplasmique : étude théorique et approches expérimentales dans le genre « *Thymus* » [en ligne]. Thèse. Montpellier : Montpellier 2. [Consulté le 6 février 2020]. 251 p.
- Martín, M.A., Monedero, E., Martín, L.M., 2017. Genetic monitoring of traditional chestnut orchards reveals a complex genetic structure. Annals of Forest Science, Springer Verlag/EDP Sciences, 2017, 74 (1), pp.15. DOI 10.1007/s13595-016-0610-1
- Meier, U., 2001. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. BBCH Monograph. DOI 10.5073/bbch0515. Archived from the original on 2018-10-15. Retrieved 2018-10-15.
- Morettini A., 1949. Biologia Fiorale del Castagno. Italia Agricola, 1949. 12, pp. 264-274
- Ollerton J., Alarcón R., Waser N.M., Price M.V., Watts S., Cranmer L., Hingston A., Peter C.I., Rotenberry J., 2009. A global test of the pollination syndrome hypothesis. Annals of Botany, 2009. 103, pp. 1471-1480.
- Olsson, M., Shine, R., Ba'k-Olsson, E., 2000. Lizards as a plant's 'hired help': letting pollinators in and seeds out. Biological Journal Of The Linnean Society, 2000. 71(2), pp. 191-20 .DOI 10.1111/j.1095-8312.2000.tb01253.x
- Pesson, P., Louveaux, J., 1984. *Pollinisation et productions végétales*. Quae. INRA, Paris, 1984. XII, p.10. ISBN-2-85340-481-1.
- Porsch, O., 1950. Geschichtliche Lebenswertung der Kastanienblüte (History of chestnut blossom).Wien., 1950. pp. 269-321.
- Rader, R., Cunningham, S.A., Howlett, B.G., Inouye, D.W., 2020. Non-bee insects as visitors and pollinators of crops: biology, ecology, and management. Annual Review of Entomology, 2019. 65, pp. 391-407. DOI 10.1146/annurev-ento-011019-025055
- R Development Core Team, 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>
- Raud, G., 1961. Étude morphologique et anatomique de la bogue du Châtaignier. Bulletin de la Société Botanique de France. 1 janvier 1961. Vol. 108, n° 3-4, pp. 130-158.
- Renner, S.S., 2014. The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. American Journal of botany, 2014. 101(10), pp. 1588-1596.
- Rosas-Guerrero V., Aguilar R., Martén-Rodríguez S., Ashworth L., Lopezaraiza-Mikel M., Bastida J.M., Quesada M., 2014. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? Ecology Letters, 2014. 17, pp. 388-400.

- Ruedenauer, F.A., Spaethe, J., Van der Kooi, C.J., Leonhardt, S.D., 2019. Pollinator or pedigree: which factors determine the evolution of pollen nutrients? *Oecologia*, 2019. 191(2), pp. 349-358. DOI 10.1007/s00442-019-04494-x
- Solignat G., Grente J., Schad C., Venot P., 1952. Recherches sur le chataignier à la St. de brive. INRA, Paris, 1952. pp. 2-89
- Solignat G., Chapa J., 1975. La Biologie Florale du Chataignier. Invuflec, Paris, 1975. pp. 5-31
- Takebayashi, N., Wolf, D., Delph, L., 2006. Effect of variation in herkogamy on outcrossing within a population of *Gilia achilleifolia*. *Heredity*, 2006, 96, pp. 159-165. DOI 10.1038/sj.hdy.6800780
- Willson, M.F. and Ågren, J., 1989. Differential floral rewards and pollination by deceit in unisexual flowers. *Oikos*, 55(1), pp. 23–29.
- Valdivieso T., Abreu C.P., Medeira C., 1993. Contribution for the study of the Chestnut Floral Biology. Antognozzi E (ed) Proc Int Cong Chestnut Univ Perugia, Perugia, 1993. pp. 95-97
- Zhang X., Ji1, Y., ZhangY., Liu, F., Chen, H., Liu J., Handberg, E.S., Chagovets, V.V., Chingin, K., 2018. Molecular analysis of semen-like odor emitted by chestnut flowers using neutral desorption extractive atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018. pp. 10. DOI 10.1007/s00216-018-1487-7
- Zirkle, C., 2017. The effect of insects on seed set of Ozark chinquapin, *Castanea ozarkensis*. Thèse de master de sciences en entomologie à l'Université d'Arkansas, Fayetteville, Etats-Unis. p 53.

11. ANNEXES

FIGURE 16 : DIAGRAMME D'ORGANISATION DU TRAVAIL ET DES OBJECTIFS



- *Comment varient : phénotype ? phénotype étendu ? entre arbres.*
- *En quoi les caractéristiques des individus impactent-elles leur communauté de pollinisateurs ? S'il y a un impact c'est que des différences de pollinisation sont notables et qu'il y a une attraction des insectes qui s'exerce via 2 types de récompenses : pollen et nectar*
- *Attraction des insectes : impact sur la pollinisation femelle /mâle => visible avec le nombre de descendants et le nombre de grain de pollen exportés*

Script R : Wilcoxon unilatéral apparié

(avec D : fichier de données .csv et Floraison : état de l'arbre en fleur ou non)

```
### Groupe d'insecte 1 : Fleuri vs Non Fleuri ###
```

```
# Sélection des données #
```

```
Ab_Non_Fleuri = D[D$Floraison == "Non_Fleuri", "Groupe_1"] # Abondances moyennes du Groupe 1 lorsque l'arbre n'est pas fleuri
```

```
Ab_Fleuri = D[D$Floraison == "Fleuri", "Groupe_1"] # Abondances moyennes du Groupe 1 lorsque l'arbre est fleuri
```

```
# Test de Wilcoxon #
```

```
###
```

```
# wilcox.test(x, y, alternative = "less", paired = TRUE)
```

```
# H0 =  $x \approx y$ , données appariées
```

```
# p-value < 0,05 =>  $x < y$ 
```

```
# ou
```

```
# wilcox.test(x,y, alternative="greater", paired=TRUE)
```

```
# H0 =  $x \approx y$ , données appariées
```

```
# p-value < 0,05 =>  $x > y$ 
```

```
###
```

```
wilcox.test(Ab_Non_Fleuri, Ab_Fleuri, alternative="less", paired=TRUE)
```

```
# Représentation graphique #
```

```
boxplot(D$Groupe_1 ~ D$Floraison, xlab = "Floraison", ylab = "Abondance moyenne", main = "Caractère floricole du Groupe 1", col = c("#FFFFAA", "#AAFFAA"))
```

```
# col = c("#FFFFAA", "#AAFFAA")colorer les boîtes à moustaches en jaune pour l'arbre Fleuri et en vert pour l'arbre Non Fleuri
```

FIGURE 17 : TEST DE WILCOXON UNILATERAL POUR SERIES APPARIEES, SCRIPT R

Script R : Fisher's Exact

```
### Groupe d'insecte 1 / Tous les autres insectes : Représentation sur Fleurs Femelles ###  
  
# Construction du tableau de contingence #  
  
Grp_1 = as.table(rbind(c(x,X), c(y,Y))) # Remplissage des cellules de la table par ligne :  
par exemple x=51, X=2008, y=15, Y=1757.  
  
dimnames(Grp_1) = list(Groupe_insectes = c("Groupe 1", "Tous autres"),  
Echelle_observation = c("Fleurs_femelles", "Arbre")) # Noms des colonnes de la table  
  
Grp_1 # Vérification du tableau de contingence  
  
>  
>Groupe_insectes      Echelle_observation  
>      Fleurs_femelles  Arbre  
>      Groupe 1          x      X  
>      Tous autres      y      Y  
  
# Test de la Probabilité Exacte de Fisher #  
  
###  
# fisher.test(Data_Table)  
  
# H0 = "Pas de différence entre les proportions d'insectes sur Fleurs femelles des deux  
groupes par rapport à celles sur Arbre"  
  
# p-value > 0,05 =>  $x \approx y$  en proportions  
# p-value < 0,05 =>  $x \neq y$  en proportions : regarder les données pour connaître le sens de  
cette différence : sur- ou sous- représenté sur les fleurs femelles.  
###  
  
fisher.test(Grp_1)
```

FIGURE 18 : TEST DE LA PROBABILITE EXACTE DE FISHER, SCRIPT R

Script R : Wilcoxon bilatéral simple

(avec D : fichier de données .csv et Type_sexuel : Astaminé ou Staminé)

```
### Groupe d'insecte 1 : Astaminé vs Staminé ###
```

```
# Sélection des données #
```

```
Ab_Asta = D[D$Type_sexuel == "Astamine", "Groupe_1"] # Abondances moyennes du  
Groupe 1 lorsque l'arbre astaminé
```

```
Ab_Sta = D[D$Type_sexuel == "Stamine", "Groupe_1"] # Abondances moyennes du  
Groupe 1 lorsque l'arbre est staminé
```

```
# Test de Wilcoxon #
```

```
###
```

```
# wilcox.test(x, y, paired = FALSE) ou wilcox.test(x, y)
```

```
#  $H_0 = x \approx y$ 
```

```
#  $p\text{-value} < 0,05 \Rightarrow x < y$  ou  $x > y \Rightarrow$  utiliser une représentation graphique pour connaître  
le sens de la préférence.
```

```
###
```

```
wilcox.test(Ab_Asta, Ab_Sta, alternative="less", paired=TRUE)
```

```
# Représentation graphique #
```

```
boxplot(D$Groupe_1 ~ D$Type_sexuel, xlab = "Type sexuel", ylab = "Abondance  
moyenne", main = "Préférence Astaminé/Staminé du Groupe 1", col = c("#FF0000",  
"#66CCFF"))
```

```
# col = c("#FF0000", "#66CCFF") colorer les boîtes à moustaches en bleu pour les arbres  
staminés et en rouge pour les arbres astaminés.
```

FIGURE 19: TEST DE WILCOXON BILATERAL SIMPLE, SCRIPT R

TABLEAU 4 : TABLEAU RECAPITULATIF DES TESTS STATISTIQUES EFFECTUES.

Tests Groupes	Floricole	Pollinisateur	Arbre Staminé vs Astaminé	Fleurs ♀ Staminé vs Astaminé	Arbre / Fleurs ♀ Staminé vs Astaminé	Phénologie
Coléoptères	***	***	ns	**	***	***
<i>Téléphores fauves</i>	***	***	ns	**	***	***
<i>Autres coléoptères</i>	***	ns	ns	ns	**	ns
Diptères	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Hyménoptères	**	***	**	ns	ns	ns
<i>Apidés</i>	***	**	***	ns	ns	ns
<i>Autres hyménoptères</i>	ns	**	ns	ns	ns	ns
3 ordres	**	NA	ns	NA	NA	***
Tous	**	NA	ns	**	***	***

TABLEAU 5 : EXTRAIT DE LA BASE DE DONNEES.

Collection	Date	Espèce	Variété	Type sexuel	Insectes	Taxons	Groupe	Sous_groupe	Ab ¹	# / flrs ♀ ²	Phéno Uni ³	Phéno Bis ³	Phéno Fem ³
A44Q_155	04/06	Hyb ⁴	Marigoule	Sta ⁵	Abeille_domestique	Apidés	Hyménoptères	Apidés	7	-	65	59	65
A44Q_155	04/06	Hyb	Marigoule	Sta	Nitidule	Coléoptères	Coléoptères	Autres Coléoptères	1	-	65	59	65
A44Q_155	04/06	Hyb	Marigoule	Sta	Charançon	Coléoptères	Coléoptères	Autres Coléoptères	1	-	65	59	65
A44Q_155	04/06	Hyb	Marigoule	Sta	Bourdon_terrestre	Apidés	Hyménoptères	Apidés	3	-	65	59	65
A44Q_155	04/06	Hyb	Marigoule	Sta	Lepture_fauve	Cerambycidés	Coléoptères	Autres Coléoptères	3	-	65	59	65
A44Q_155	04/06	Hyb	Marigoule	Sta	Moustique	Autres	Diptères	Diptères	1	-	65	59	65
A44Q_177	26/06	Hyb	Marigoule	Sta	Telephore_fauve	Cerambycidés	Coléoptères	Téléphore fauve	8	-	69	65	65
A44Q_177	26/06	Hyb	Marigoule	Sta	Coccinelle_mue	Autres	Larves		1	-	69	65	65
A44Q_177	26/06	Hyb	Marigoule	Sta	Vespide	Vespidés	Hyménoptères	Autres Hyménoptères	1	-	69	65	65
A44Q_177	26/06	Hyb	Marigoule	Sta	Syrphe_porte- plume	Syrphes	Diptères	Diptères	3	1	69	65	65
A58O_157	06/06	Hyb	Bétizac	Asta ⁶	Coccinelle_larve	Larves	Coléoptères	Autres Coléoptères	2	-	65	59	65
A58O_157	06/06	Hyb	Bétizac	Asta	Charançon	Coléoptères	Coléoptères	Autres Coléoptères	1	-	65	59	65
...													

¹ Abondance, ² Nombre d'insectes observés sur fleurs femelles, ³ Phénologie des châtons unisexués, bisexués, et des fleurs femelles, ⁴ Hybride, ⁵ Staminé, ⁶ Astaminé