

Le rôle du téléphore fauve (*Rhagonycha fulva*) dans la pollinisation du châtaigner

Organisme : Biogeco INRAE

UMR Biodiversité, Gènes et Communautés

Sous l'encadrement de :

Rémy Petit

Olivier Lepais

Clément Larue

Sarah GENTET



MASTER BIOLOGIE VÉGÉTALE
—PHYTORÉSSOURCES & PHYTOSCIENCES—



Sommaire

I.	Introduction.....	3
II.	Matériels et Méthodes	5
a)	Site d'étude et échantillonnage	5
b)	Traitement préalable des insectes	5
c)	Sexage et mesures morpho métriques des insectes	6
d)	Charge en pollen	7
e)	Analyses statistiques	7
III.	Résultats.....	8
a)	Sex-ratio	8
b)	Dimorphisme sexuel	8
c)	Comptage de pollen	10
i)	Précision	10
ii)	Exhaustivité de la mesure : proportion de pollen récupérée avec un seul lavage.....	12
d)	Transport du pollen	13
i)	Quantité de pollen transportée	13
ii)	Facteurs influençant la charge pollinique de l'insecte.....	13
IV.	Discussion	15
V.	Vers l'analyse génétique de la charge en pollen des insectes.....	18
	Remerciements	21
	Bibliographie	21



Figure 1 : Téléphore fauve (*Rhagonycha fulva*)

I. Introduction

La pollinisation chez les plantes à graines (appelées spermatophytes, qui incluent les angiospermes et les gymnospermes) est l'apport de grain de pollen (gamétophyte mâle) sur la partie terminale du pistil. C'est ce processus qui conditionne la vie d'une grande partie des végétaux que nous connaissons, qu'ils soient sauvages ou cultivés. Dans environ 87% des cas, cette pollinisation est assurée par des animaux (Ollerton et al. 2011). Notre alimentation dépend elle aussi en bonne partie de ces pollinisateurs (FAO, 2020). L'importance de la pollinisation pour la survie des populations de plantes et pour notre alimentation est donc considérable et permet de sensibiliser à l'enjeu global du maintien de la biodiversité. Améliorer notre compréhension de ce mécanisme qui prend des formes très diverses est donc important d'un point de vue écologique, économique et culturel.

Mon stage s'inscrit dans le cadre du programme de recherche sur la pollinisation du châtaignier (projet : Rémy Petit ; thèse : Cément Larue) conduit au sein de l'équipe ECOGERE de l'UMR Biogeco. Le châtaignier, arbre à la fois forestier et fruitier, est la troisième essence forestière feuillue en France (derrière les chênes et le hêtre). Il représente environ 50% de la surface mondiale de la châtaigneraie à bois (Châtaignier – CNPF, 2021). Les vergers de châtaigniers couvrent en France environ 12 000 hectares (Verger moderne de châtaignier, Invenio, 2017). L'objectif de ce programme de recherche est d'étudier le mécanisme de la pollinisation du châtaignier et ses conséquences sur la production fruitière. Le châtaignier était considéré encore récemment comme majoritairement anémophile. Les travaux menés à Biogeco (Larue et al. 2020) ont montré qu'il s'agit en fait d'une espèce entomophile. En effet, les branches isolées des insectes à l'aide de filets mais laissant passer le vent produisent très peu de fruits. L'accès des insectes aux fleurs est donc déterminant pour le succès de sa pollinisation. L'observation directe des insectes visitant les fleurs de châtaignier a montré que, sur le site d'étude de l'INRAE près de Bordeaux, l'insecte le plus abondant sur les arbres, et tout particulièrement sur les fleurs femelles (là où s'effectue la pollinisation), est un coléoptère de la famille des Cantharidae, le téléphore fauve (*Rhagonycha fulva*) (figure 1). C'est donc notre principal candidat comme pollinisateur du châtaignier. Cet insecte est caractérisé par un dimorphisme sexuel, les femelles étant plus grandes et plus lourdes que les mâles (Rodwell et al. 2018). Des travaux de capture-marquage-recapture ont montré que les mâles se déplacent plus loin que les femelles (Rodwell et al. 2018). Les deux sexes pourraient donc jouer un rôle contrasté dans la pollinisation. En effet, il arrive que chez les insectes les différences entre les sexes pour la pollinisation soient plus importantes que celles entre espèces (Smith et al 2018).

Cela nous a encouragé à étudier le rôle respectif des téléphores mâles et femelles dans la pollinisation du châtaignier. Nos hypothèses sont les suivantes : (1) les téléphores ont des charges en pollen de châtaignier élevées, et (2) les mâles transportent plus de pollen de châtaignier, venant de plus loin,

que les femelles. Pour répondre à ces questions, des téléphores fauves ont été échantillonnés dans un verger afin d'étudier leur charge pollinique (nombre et origine des grains de pollen) via des approches complémentaires : approche microscopique d'identification morphologique et estimation du nombre de grains de pollen, et approche moléculaire de caractérisation génétique du pollen présent sur le corps des insectes pour caractériser le nombre et identifier les arbres donneurs de pollen. Pour cela trois variétés bien distinctes de châtaignier ont été choisies : une variété astaminée, une mésostaminée et une longistaminée. Les variétés astaminées sont celles dont les étamines sont avortées, elles ne produisent donc pratiquement pas de pollen (arbres mâles-stériles), tandis que les variétés longistaminées ont des étamines bien développées qui vont produire beaucoup de pollen. Les variétés mésostaminées sont intermédiaires et produisent un peu de pollen. L'avantage de disposer d'arbres ne produisant pas de pollen (variétés mâle-stériles) est que si les insectes qui y sont prélevés ont du pollen de châtaignier sur leur corps, ils l'ont nécessairement obtenu en visitant d'autres arbres. Pour les insectes récoltés sur des arbres mâles-fertiles, par contre, le pollen peut venir de l'arbre lui-même (auto-pollen). On s'attend donc à ce que les insectes récoltés sur les arbres astaminés aient moins de pollen sur leur corps que ceux prélevés sur la variété mésostaminée et encore moins que ceux prélevés sur la variété longistaminée. Pour mieux interpréter les éventuelles différences de charge pollinique entre les téléphores fauves mâles et femelles, des données sur les traits fonctionnels de cette espèce ont été recueillies. L'idée est de mieux caractériser le dimorphisme sexuel chez cette espèce et notamment de comparer les différences d'aptitudes à la dispersion et de comportement des deux sexes et leur rôle respectif dans la pollinisation du châtaignier.

Le châtaignier est un arbre cultivé à l'aide de greffes (variétés clonales) qui ne peut s'autoféconder (espèce auto-incompatible) (Larue et al. 2021). Pour contribuer à la pollinisation, l'insecte doit de ce fait obligatoirement transporter de l'allo-pollen (pollen issu d'un arbre appartenant à une variété différente). Pour aborder cette question rarement explorée, de nouvelles approches sont nécessaires, qui restent à développer. Une analyse de paternité du pollen récupéré sur le corps des insectes et s'appuyant sur des marqueurs microsatellites permettrait de déterminer la variété de l'arbre ayant produit le pollen (Matzuki et al. 2008, Hasegawa et al. 2015). Plutôt que de travailler sur des grains de pollen isolés, comme dans le travail de Matzuki et al. (2008), une solution plus efficace et plus rapide consisterait à analyser la totalité du pollen récupéré sur chaque insecte à l'aide d'approches de type barcoding. Si l'insecte transporte bien du pollen produit par un arbre autre que celui sur lequel il a été échantillonné, cela conforterait l'hypothèse de son implication dans la pollinisation. Avant de se lancer dans de tels travaux, une étude de faisabilité est nécessaire.

II. Matériel et méthode

a) Site d'étude et échantillonnage

Dans le verger conservatoire INRAE de Villenave d'Ornon, six arbres de trois variétés ont été choisis. Sur chacun, 100 téléphores fauves ont été prélevés (600 insectes en tout) le 20 juin 2020. Les trois variétés de châtaignier sont représentées chacune par deux arbres différents situés dans deux parties différentes du verger (A et E). Les variétés étudiées sont les suivantes :

- Bouche de Bétizac (*C. sativa* x *C. crenata* ; variété astaminée), 2 arbres (A58O et E80E), 2x100 insectes ;
- Maridonne (*C. sativa* ; variété longistaminée), 2 arbres (A60Q et E50P), 2x100 insectes ;
- Marlhac (*C. sativa* ; variété mésostaminé), 2 arbres (A66Q et E73D), 2x100 insectes.

En outre, 18 insectes ont été prélevés sur un arbre de la variété Marigoule (*C. sativa* x *C. crenata* ; variété mâle-fertile, A44Q) pour effectuer les tests de mise en place du protocole (lavages, comptages...).

b) Traitement préalable des insectes

Chaque insecte est immédiatement mis dans un tube Eppendorf de 1,5mL après avoir été capturé sur le terrain. Ils sont ensuite conservés à -20°C. Au laboratoire, un identifiant unique est affecté à chaque spécimen étudié avant toute manipulation.

Pour l'analyse de la charge en pollen, nous avons adapté la méthode décrite dans Pornon et al. (2019) et Baksay (2020). Sous hotte aspirante, 300 µL de tampon de lyse CF (Kit nucleoSpin foodMacherey-Nagel) sont ajoutés au tube contenant l'insecte. Le tube est ensuite placé dans un agitateur Geno Grinder - SPEX SamplePrep) et mis à agiter 3x2 min à 500 oscillations/min. L'insecte est ensuite retiré délicatement à l'aide de pinces souples entomologiques et placé dans un nouveau tube Eppendorf étiqueté avec le même code. De même, 60 µL de la solution de lavage sont prélevés et transférés dans un tube Eppendorf de 1,5 mL avec la même étiquette. Ces aliquots sont utilisés pour le comptage du

pollen. Enfin, 310 μL de Tampon CF sont alors ajoutés à la solution de lavage restante pour l'extraction d'ADN. A partir de chaque insecte, on obtient ainsi trois tubes pour les trois types d'analyses suivantes (morphométrie, comptage de pollen et extraction d'ADN).

c) Sexage et mesures morphométriques des insectes

Toutes les mesures et sexages ont été réalisés par Bérengère Curtis, assistante-ingénieur à Biogeco. Les 300 insectes ont été sexés sous loupe binoculaire (Leica EM4), selon les critères décrits dans Rodwell et al. (2018), ainsi qu'en s'appuyant sur l'examen des génitalia (Magis et al. 1963), facilement différenciables entre les sexes (figure 2).



Figure 2 : femelle (gauche) et male (droite) de téléphores fauves

Les mesures de taille des insectes ont été prises à l'aide d'un micromètre (Leica EM4). Une mesure a été effectuée pour l'abdomen et une pour la taille des élytres. Ces mêmes insectes ont également été étuvés puis pesés par Grégoire Pauly, stagiaire à Biogeco. Afin d'étudier plus en détail le dimorphisme sexuel, plusieurs mesures de taille de différents organes ont été réalisées (figure 3) sur 24 insectes de chaque sexe par Bérengère Curtis. Nous avons sélectionné les mesures et ratios intéressants pour l'étude des traits fonctionnels de ces insectes, notamment ceux renseignant sur leurs aptitudes à la dispersion.

d) Mesures de charge en pollen

Les comptages de pollen (châtaigner d'une part ; autres espèces que le châtaignier d'autre part) ont été réalisés sur cellule de Malassez sous microscope optique (Baksay et al. 2020, Matzuki et al. 2008, Desprès et al. 2003). J'ai effectué plusieurs comptages indépendants par échantillon pour déterminer la précision nécessaire pour l'étude (cf. Résultats).

Afin d'estimer la proportion de pollen récupérée dans la solution de lavage, on peut procéder à des lavages successifs suivis de nouveaux comptages du pollen récupéré. Nous faisons l'hypothèse que la quantité de pollen récupérée à chaque lavage successif suit une suite géométrique de raison q et de premier terme U_0 (U_0 correspond à la quantité de pollen récupérée lors du premier lavage, où $U_{n+1} = q * U_n$). Pour estimer q , une série de 12 insectes a été lavée deux fois successivement. Le rapport entre la quantité récupérée au premier lavage et la quantité récupérée au deuxième lavage nous sert alors d'estimateur de q . Cette estimation de q nous permet d'estimer la quantité de pollen total présent sur le corps de l'insecte ainsi que le pourcentage récupéré au premier lavage :

$$\text{Charge pollinique totale} = \text{CPT} = \sum_0^{\infty} U_n = \frac{U_0}{(1-q)}$$

$$\text{Pourcentage récupéré au premier lavage} = \frac{\text{CPT}}{U_0} * 100$$

e) Analyse statistique

Les insectes qui n'ont pas pu être sexés ne sont pas pris en compte dans l'analyse. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R.studio ([RStudio-1.4.1106.exe](#)). Les données issues de l'analyse morphométrique suivent une loi normale (test de Shapiro fait au préalable) et ont donc été comparées avec un test T de Student. Au contraire, la mesure de la charge pollinique provient d'un comptage, elle est donc quantitative discrète, bornée à 0 et devrait suivre une loi de probabilité de la famille Poisson. Pour illustrer les différences de charges en pollen entre modalités, des boîtes à moustache ont été utilisées. Les charges en pollen ont été comparées entre catégories avec des tests non paramétriques de Wilcoxon.

J'ai réalisé une analyse de covariance, en prenant en compte les facteurs variété de l'arbre sur lequel l'insecte est échantillonné (cf. la production différentielle de pollen selon la variété) et le sexe de l'insecte. Je teste l'interaction entre ces deux variables car je fais l'hypothèse que la différence entre sexes est essentiellement due à la plus forte proportion d'allo-pollen sur les mâles et serait plus visible

sur les insectes échantillonnés sur les arbres mâles stériles. Les variables taille et poids de l'insecte sont ajoutées en co-variables.

Comme les données sont supposées suivre une loi Poisson, j'ai tout d'abord testé un GLM (*General Linear Model*) de la famille Poisson. Du fait de la sur-dispersion des données, c'est le modèle *negative binomial* qui est adapté (rcompagnon, 2015).

On effectue ensuite une Ancova (Analyse de Co Variance) via la fonction Anova du package « Car » en exécutant un test LR (*likelihood ratio test*) adapté au GLM.

Pour les données de comptage de pollen d'espèces de plantes autres que le châtaignier, au vu de la forte proportion d'insectes ayant une charge nulle, j'ai décidé d'utiliser un GLM de la famille binomiale (le succès étant défini comme une présence de pollen autre que châtaignier dans les données de comptage et l'échec une absence).

Concernant les analyses de dimorphisme sexuel, toutes les mesures ont été comparées entre sexes avec un test T (distribution testée avec le Shapiro test préalablement). Une ACP a également été réalisée sur les mesures effectuées sur les 48 insectes.

III. Résultats

a) Sex-ratio

Sur les 300 insectes étudiés, 293 ont pu être sexés (les individus qui n'ont pas pu être sexés sont retirés de l'expérience). Nous avons identifié 201 mâles et 92 femelles, correspondant donc à un sex-ratio fortement biaisé en faveur des mâles (sex-ratio moyen de 2,3. Le test de χ^2 (testant l'écart entre les effectifs observés et ceux attendus sous l'hypothèse d'une même proportion de mâles et de femelles) montre que cet écart est très significatif ($p = 6.10^{-6}$).

b) Dimorphisme sexuel

Les mesures morphométriques ont confirmé que les mâles étaient plus petits que les femelles. Cette différence de taille est importante : en effet les femelles ont un abdomen en moyenne plus grand de 27% que celui des mâles. Et surtout, les femelles sont beaucoup plus lourdes que les mâles (3 fois plus lourdes en moyenne, Tableau 2).

Si on regarde la corrélation entre la taille et le poids selon les sexes (Figure 3), on s'aperçoit que les pentes sont très différentes. En effet, le poids augmente beaucoup plus rapidement en fonction de la taille chez les femelles.

Table 2: Moyenne des mesures de longueur de l'abdomen et du poids (pour 293 insectes) en fonction du sexe de l'insecte, et comparaison entre les sexes.

	Abdomen (mm)	Poids (mg)
Femelle	5,8 SE ± 0,6	22,3 SE ± 8.2
Mâle	7,4 SE ± 0,8	7,0 SE ± 2.3
T.test Mâle-Femelle	$p < 10^{-16}$	$p < 10^{-16}$

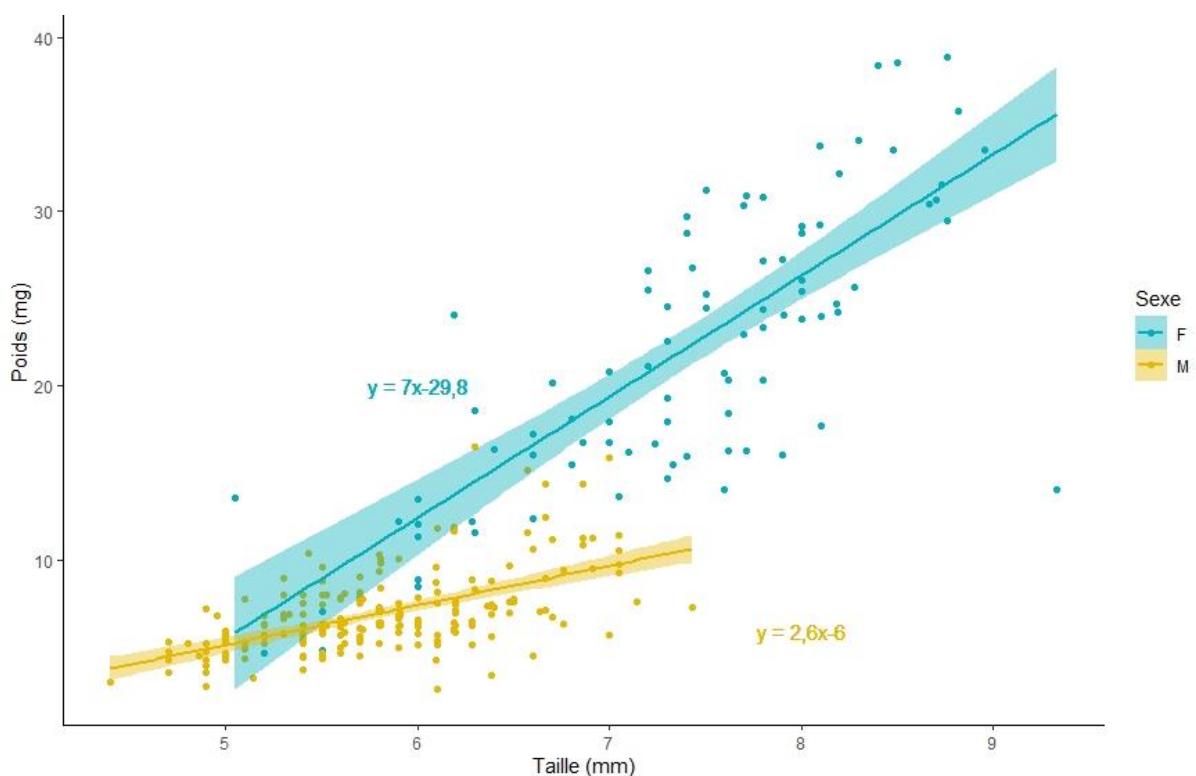


Figure 3 : Corrélation entre la taille et le poids des insectes selon le sexe

Globalement, les analyses morpho métriques effectuées sur les 24 femelles et 24 mâles montrent que les femelles ont une charge alaire plus élevée, des tibias, des fémurs et une tête proportionnellement

plus petits par rapport à leur taille, des yeux plus petits et des antennes plus courtes que les mâles (figure 4).

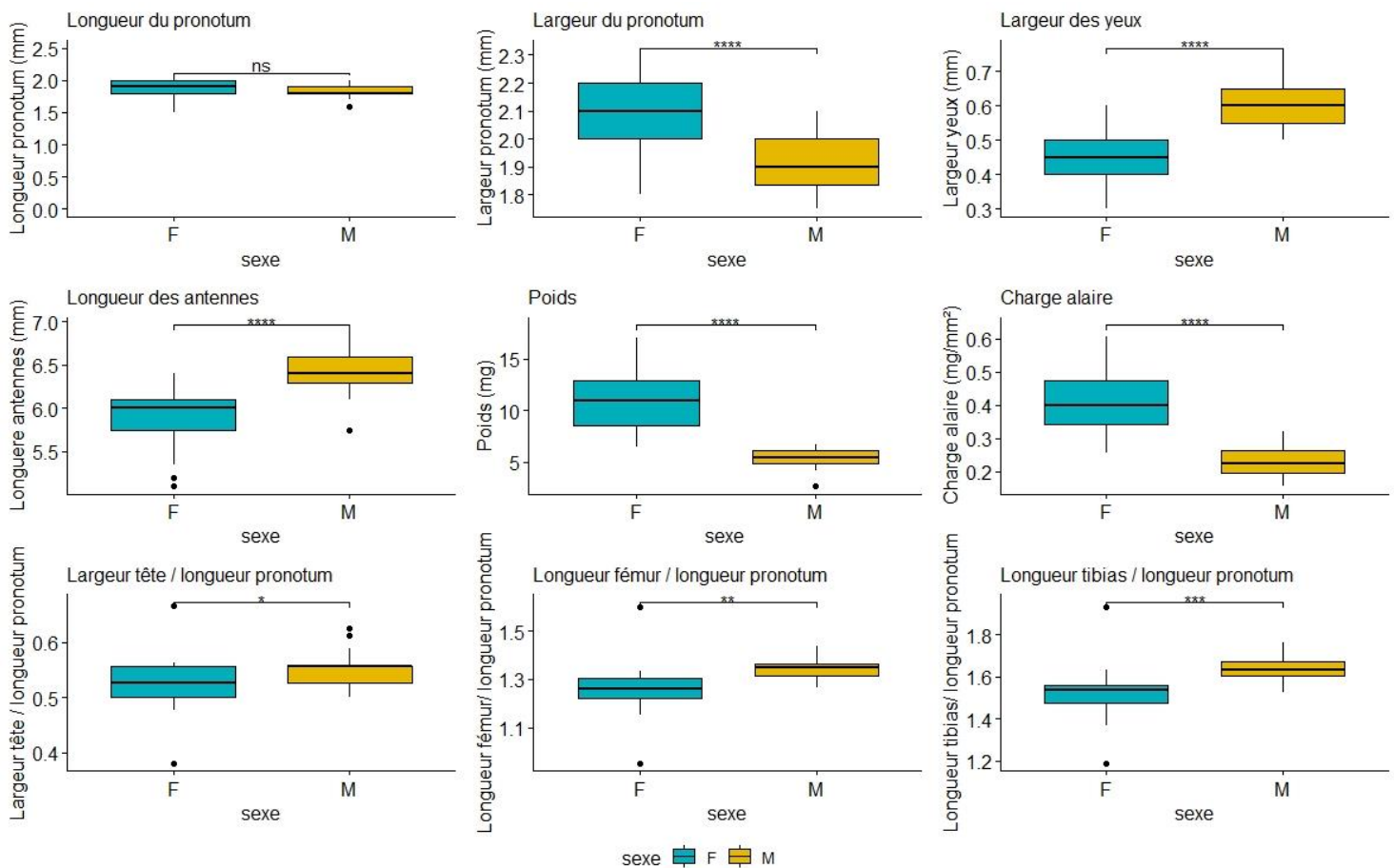


Figure 4 : Boîtes à moustaches comparant plusieurs mesures de traits et ratios chez les mâles et les femelles de téléphores fauves.

c) Comptages de pollen

i) Précision

Afin de déterminer la précision des mesures de comptage de pollen, 10 comptages indépendants ont été effectués sur cinq échantillons tests. Le graphique ci-dessous (Figure 5) a été construit pour illustrer l'évolution de la moyenne de la charge pollinique selon le nombre de mesures effectuées (de 1 à 10). Les tirages sont aléatoires et sans remise. La moyenne des 10 répétitions sert de référence. Vu la grande répétabilité des mesures et les différences importantes entre insectes, nous avons retenu un nombre de deux répétitions par échantillon.

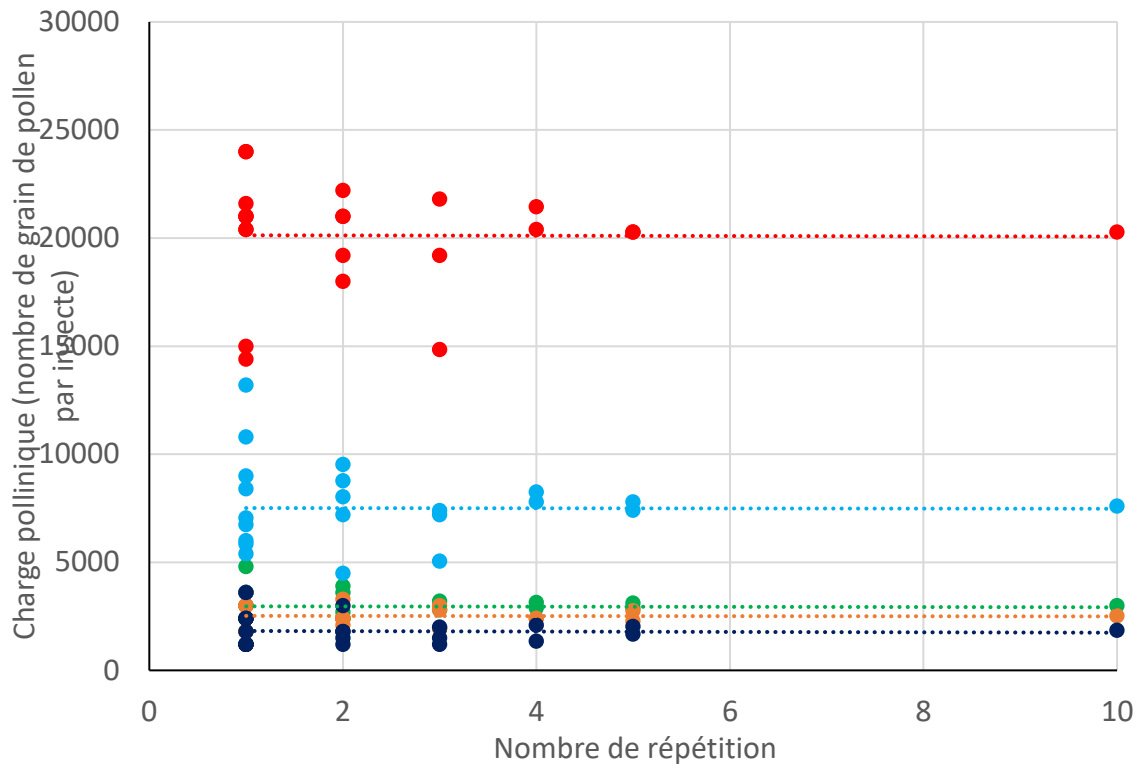


Figure 5 : Moyenne des charges polliniques en fonction du nombre de répétition de comptage pour cinq échantillons tests (chaque échantillon est représenté par une couleur)

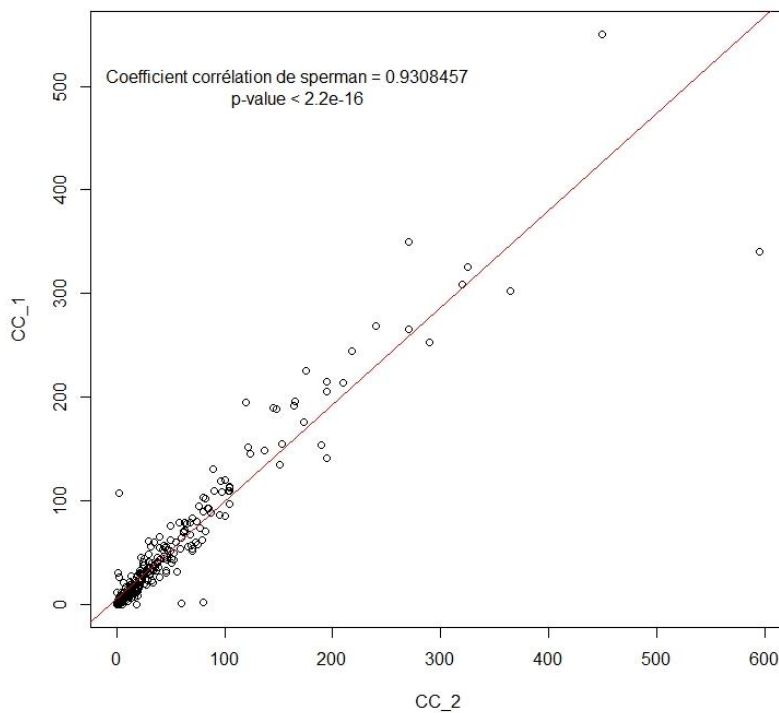


Figure 6 : Comparaison des résultats de charge en pollen entre le premier et le deuxième comptage

La répétabilité des mesures est élevée : R^2 de 0,9 (Figure 6).

ii) Exhaustivité de la mesure : proportion de pollen récupérée avec un seul lavage

L'estimation de la proportion de pollen récupérée lors d'un lavage est obtenue à l'aide des 12 mesures de charge polliniques successives.

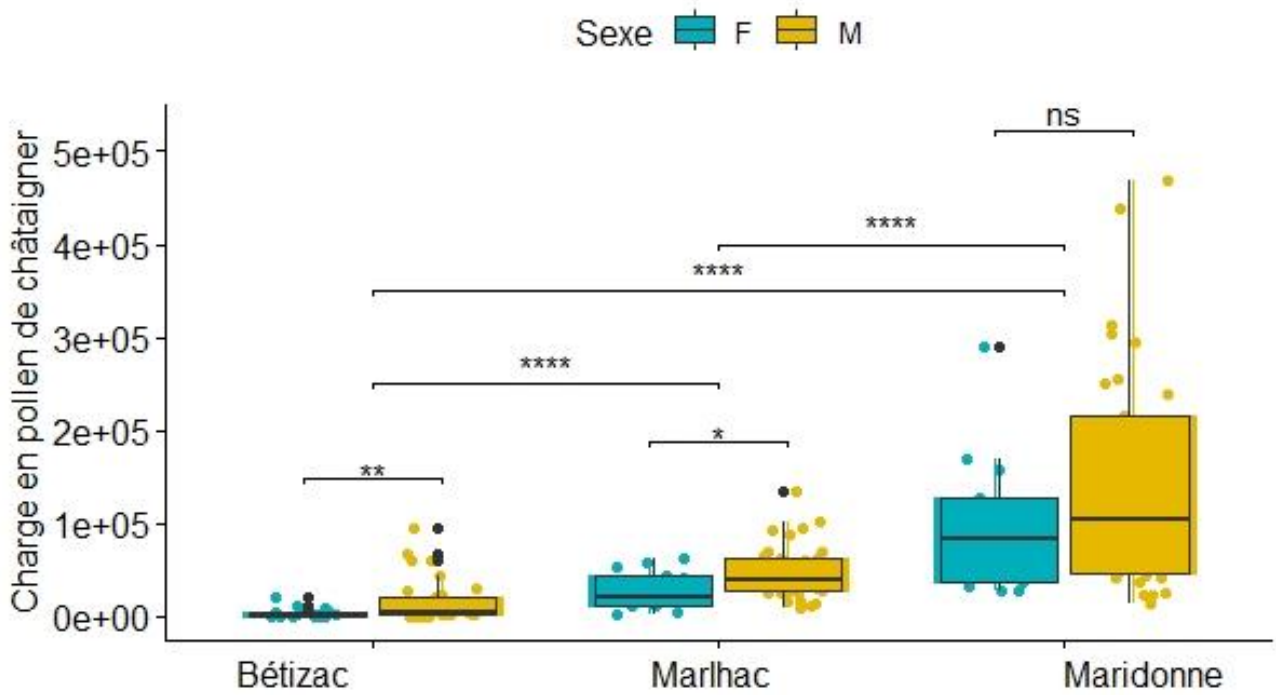
Table 3 : moyenne des charges polliniques de 12 insectes lors de deux lavages successifs.

Echantillon	Lavage 1	Lavage 2
1	24687	6875
2	27500	9375
3	2187	1562
4	8125	3125
5	28125	17500
6	17812	10625
7	35000	10000
8	7187	8125
9	9375	15312
10	89375	13750
11	61875	13125
12	28750	11875
Moyenne	28333	10104

Le rapport des moyennes lavage 2/lavage 1 = q = 0.35. On en déduit la charge en pollen totale moyenne pour ces 12 échantillons :

On récupère donc 65% (28333/43589) du pollen total transporté par l'insecte lors du premier lavage.

Parcelle A



Parcelle E

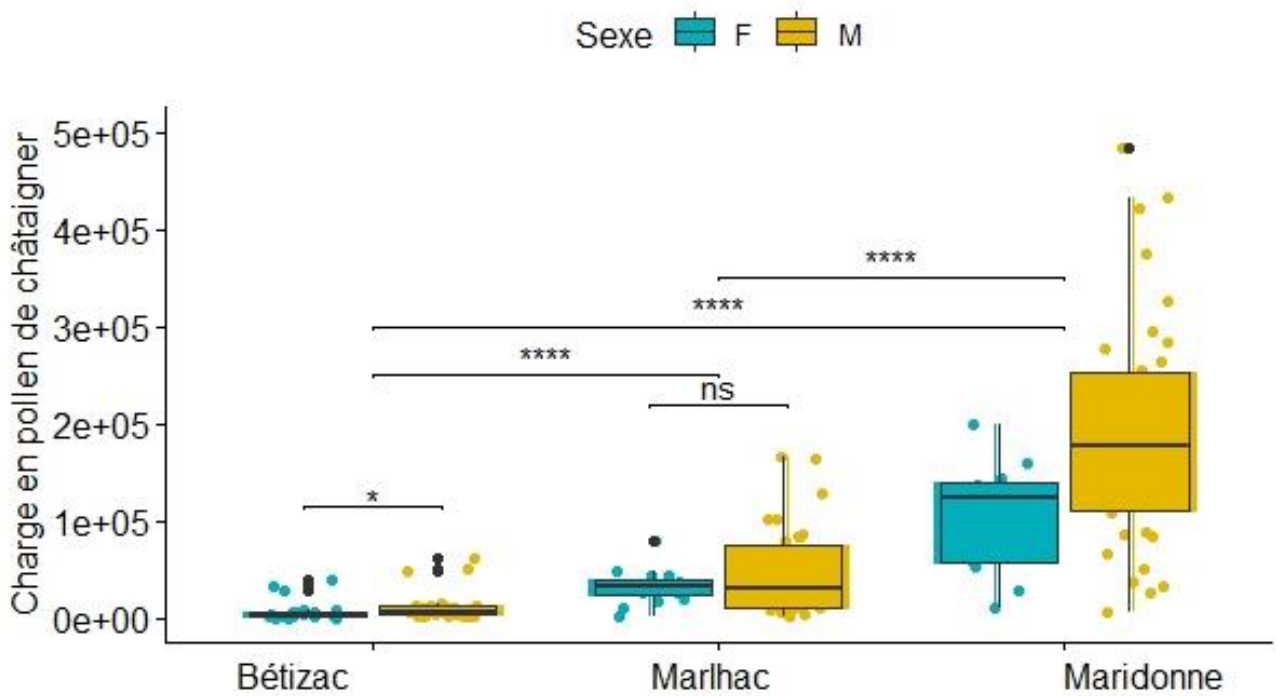


Figure 7 : Boîtes à moustaches des charges polliniques (pollen de châtaigner) des 293 insectes selon leur sexe et la variété de châtaigner sur laquelle ils ont été échantillonnés pour les deux parcelles étudiées.

d) Transport du pollen

i) Quantité de pollen transporté

Les 300 estimations de charges en pollen, corrigées grâce à l'estimation ci-dessus de la proportion de pollen récupérée lors du premier lavage, varient de 0 (8 insectes) à 482 812 grains de pollen, avec une moyenne de 67 565 grains de pollen par insecte.

ii) Facteur influençant la charge pollinique de l'insecte

Les moyennes des charges polliniques (nombre de grains de pollen transportés sur le corps des insectes) selon la variété de châtaignier sur laquelle les insectes ont été échantillonnés sont présentées dans le tableau ci-dessous. Pour les deux parcelles confondues, on trouve une forte différence de la charge en pollen selon la variété de l'arbre : sur Bétizac, variété mâle-stérile, la charge est la plus faible, sur Marlhac, variété à fertilité réduite, elle est intermédiaire et sur Maridonne, variété mâle-fertile, elle est la plus élevée. Les moyennes sont donc plus élevées pour les individus échantillonnés sur les arbres produisant plus de pollen ; par ailleurs, elles sont plus élevées pour les insectes mâles, toutes variétés de châtaigner confondues (table 4 ; figure 7).

Table 4 : Moyennes des charges polliniques des insectes en fonction de leur sexe et de la variété de l'arbre sur laquelle ils ont été échantillonnés.

Variété	Phénotype	Femelle	Mâle
Bétizac	Astaminé	5 567	13 945
Marlhac	Mésostaminé	29 741	49 096
Maridonne	Longistaminé	100 537	170 902

Le test de Wilcoxon met en évidence des charges en pollen significativement différentes selon la variété sur laquelle les insectes ont été échantillonnés au sein d'une même parcelle, ainsi qu'entre mâles et femelles pour les deux arbres de la variété Bétizac et pour un des deux arbres chez les variétés Maridonne et Marlhac. On note également qu'il y a des différences significatives de charge en pollen entre les insectes mâles et femelles chez Bétizac dans les deux parcelles et dans une parcelle sur deux pour Marlhac et Maridonne (Figure 6).

L'Ancova indique que le sexe des insectes et la variété de l'arbre sur laquelle ils ont été échantillonnés ont un effet significatif sur la charge en pollen de châtaigner de l'insecte. En revanche il n'y a pas d'effet de la taille de l'insecte ni de la parcelle où sont localisés les arbres. De plus la taille des insectes n'influe pas sur la charge pollinique en pollen de châtaigner, et on n'a pas mis en évidence d'interaction entre le sexe et la variété (Table 4). Dans un deuxième modèle on a ajouté la co-variable poids, on voit qu'elle a un effet significatif sur la charge en pollen de châtaigner (table 5). En revanche, l'effet du sexe n'est plus présent, comparé au premier modèle. Nous avons donc décidé d'analyser l'effet du poids sur la charge en pollen des deux sexes pris séparément. On voit qu'il a un effet significatif du poids de l'insecte sur la charge en pollen chez les femelles uniquement. Dans un troisième modèle nous avons intégré la co-variable taille de l'insecte : celle-ci n'a toujours pas d'effet.

Table 4: Résultat de l'Ancova pour l'effet sur la charge pollinique en pollen de châtaigner des 293 insectes, du sexe de l'insecte, de la variété de l'arbre et de l'interaction sexe x variété.

	LR χ^2	DDL	Pr ($>\chi^2$)
Sexe	19,9	1	8.10^{-6}
Variété	248,5	2	$<2.10^{-16}$ **
Sexe * Variété	2,4	2	0,3

Table 5: Résultat des Ancovas pour l'effet sur la charge pollinique en pollen de châtaigner des 293 insectes, du sexe de l'insecte, de la variété de l'arbre et de l'interaction sexe x variété avec la taille et le poids de l'insecte ajoutés en co-variables.

	LR χ^2	Poids en co-variable		Taille en co-variable		
		DDL	Pr ($>\chi^2$)	LR χ^2	DDL	Pr ($>\chi^2$)
Sexe	1,1	1	0,3	7,6	1	6.10^{-3} **
Variété	251,4	2	$<2.10^{-16}$ ***	249,3	2	$<2.10^{-16}$ ***
Sexe * Variété	4,4	2	0,1	3,1	2	0,2
Poids	5,5	1	0.02*	-	-	-
Taille	-	-	-	1,1	1	0,3

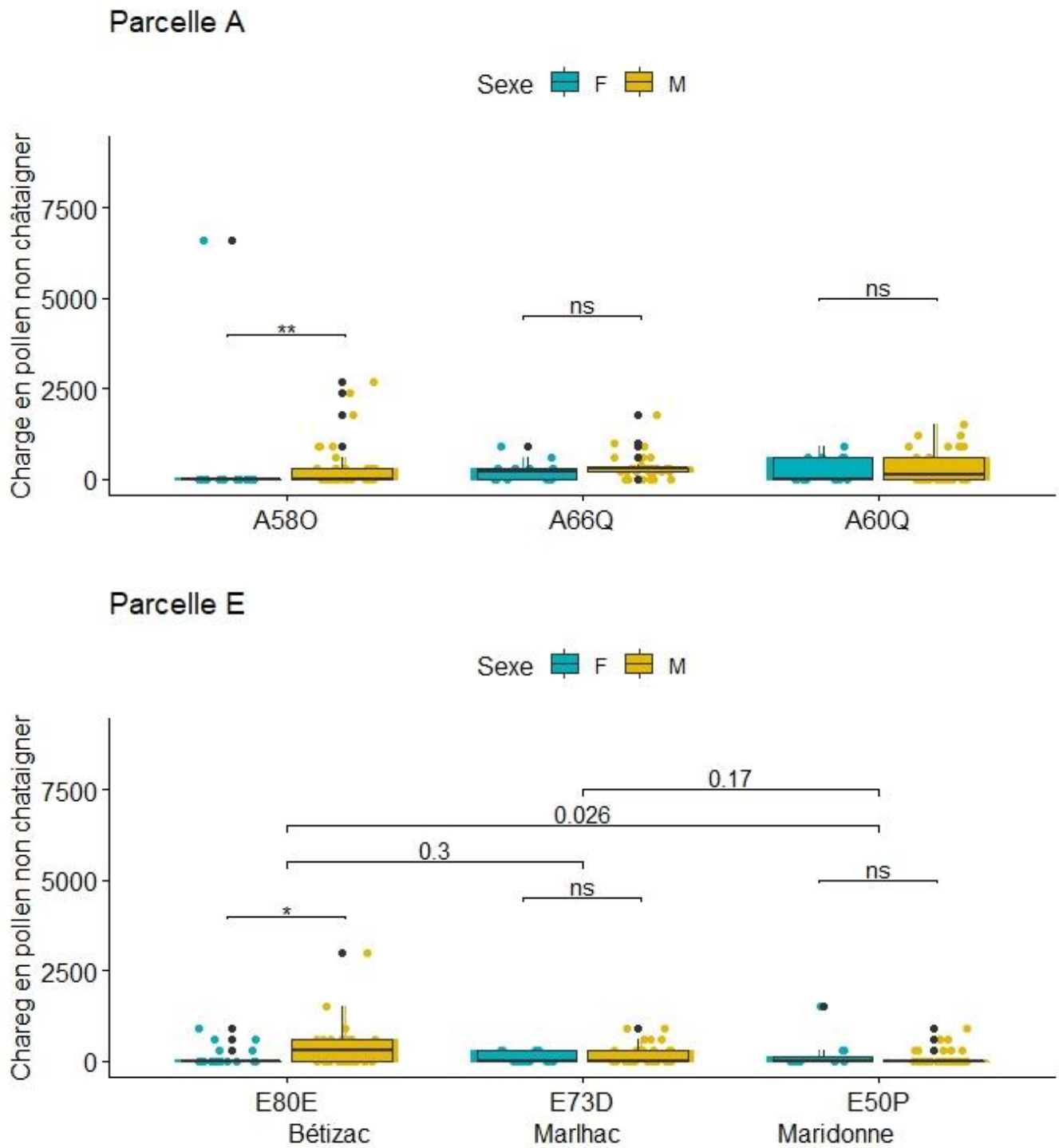


Figure 8 : Boîtes à moustaches des charges en pollen autres que le châtaigner pour les 293 insectes selon leur sexe et la variété de châtaigner sur laquelle ils ont été échantillonnés, pour les deux parcelles étudiées.

Table 6 : Résultat des Ancovas pour l'effet du poids sur la charge pollinique en pollen de châtaigner des 293 insectes, séparément selon les sexes.

	Femelles			Mâles		
	LR χ^2	DDL	Pr ($>\chi^2$)	LR χ^2	DDL	Pr ($>\chi^2$)
Variété	65,7	2	$<2.10^{-16}$ ***	203	2	$<2.10^{-16}$ ***
Poids	5,7	1	0,02*	1	1	0,29

Contrairement à ce qui a été trouvé pour la charge en pollen de châtaigner, la variété ne semble pas influencer sur la présence des autres pollens transportés par les insectes. Par contre, la différence entre insectes mâles et femelles est retrouvée, surtout lorsque l'insecte est prélevé sur un arbre produisant peu de pollen (Figure 8).

Charge pollen non châtaigner ~ Sexe + Parcelle

Table 7 : Résultat de l'Ancova pour la charge pollinique de pollen « non châtaigner » des 293 insectes.

	Df	LR χ^2	Pr($>\chi^2$)
Sexe	1	3,97	0,046*
Parcelle	1	9,61	0,0019**

A la différence de la charge en pollen de châtaigner, l'Ancova indique cette fois un effet parcelle. Sinon on retrouve comme pour le pollen de châtaigner une effet sexe : les téléphores mâles transportent plus de pollen « non châtaigner » que les femelles (Table 7).

IV) Discussion

Ce travail démontre que l'espèce *Rhagonycha fulva* transporte une grande quantité de pollen, en particulier celui de châtaigner, avec une moyenne de 67000 grains de pollen par insecte, soit l'équivalent de plus de 13 anthères en comptant 5000 grains de pollen par anthère (Larue et al. 2020). L'effet important de la variété de l'arbre sur lequel l'insecte a été capturé sur la charge en pollen montre que la quantité de pollen transportée par les insectes est essentiellement de l'auto-pollen. En

effet, les insectes récoltés sur des arbres longistaminés ont une charge en pollen 22 fois plus élevée que ceux récoltés sur des arbres mâles-stériles. Une première hypothèse serait que l'insecte perde beaucoup de pollen lors de ses trajets entre arbres ; une autre hypothèse serait que l'insecte visite peu d'arbres et qu'il a donc fréquemment été échantillonné sur le premier arbre visité.

Deuxièmement, j'ai montré que les insectes mâles ont une plus grande charge pollinique (pollen de châtaigner mais aussi pollen d'autres espèces que le châtaigner) que les femelles (effet sexe de l'Ancova). La différence est particulièrement forte chez les insectes échantillonnés sur les arbres de la variété mâle-stérile (Bétizac). Néanmoins, je n'ai pas mis en évidence d'interaction sexe-variété dans notre Ancova, comme attendu si la différence de charge pollinique entre mâles et femelles dépendait essentiellement de la quantité d'allo-pollen.

Par ailleurs, la variable taille de l'insecte n'a pas d'effet significatif et ne change que très peu les effets des autres variables dans l'Ancova, on peut donc conclure que la taille de l'insecte n'influe pas fortement sur sa charge pollinique, contrairement à ce qui a été trouvé chez d'autres insectes, pour lesquels une proportionnalité entre taille de l'insecte et charge en pollen a pu être confirmée (Desprès et al. 2003). En revanche l'ajout de la variable poids (très liée au sexe, les femelles étant en moyenne trois fois plus lourdes que les mâles) fait disparaître l'effet sexe, ce qui m'a conduit à étudier séparément l'effet du poids sur la charge en pollen pour chaque sexe. J'ai ainsi mis en évidence un effet significativement négatif du poids sec de l'insecte sur la charge en pollen chez les insectes femelles, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que durant la production des œufs elles grossissent énormément, augmentant rapidement leur charge alaire. Cela pourrait ainsi affecter leurs déplacements, peut-être même au sein d'un arbre, limitant ainsi leur capacité à se couvrir de pollen.

Globalement, la combinaison d'un effet sexe de l'insecte pour la charge en pollen de châtaigner et pour la charge en autres pollen, et d'un effet poids des femelles sur la charge en pollen de châtaigner, conforte l'idée du rôle important de la dispersion dans la constitution de la charge en pollen de chaque insecte (Fitton 1973 ; Rodwell 2018).

L'analyse du dimorphisme sexuel des téléphores conforte l'idée que les femelles ont de plus faibles aptitudes de dispersion que les mâles, comme cela a été montré expérimentalement (Rodwell et al. 2018). En effet, les femelles sont beaucoup plus lourdes que les mâles et ont en conséquence une charge alaire beaucoup plus importante, ce qui devrait les handicaper dans leurs déplacements aériens entre arbres. De même on observe que les fémurs et tibias sont proportionnellement plus courts chez les femelles. On peut donc supposer qu'elles ont aussi des déplacements moins aisés y compris sur un même arbre, diminuant peut-être leurs interactions avec les fleurs femelles.

Selon Gaffney et al. (2018), plusieurs espèces de coléoptères se servent des inflorescences comme lieux de recherche de partenaire et d'accouplement. L'idée est que le châtaigner servirait de « lieu de rencontre » (« *mating rendez-vous* ») et d'accouplement. Cela nous amène à repenser la stratégie de pollinisation du châtaigner et faire l'hypothèse suivante : les femelles, qui se déplacent peu et offrent donc un service de pollinisation limité, seraient attirées par la source de nourriture et l'abri que le châtaigner peut leur fournir. Les mâles, plus mobiles notamment du fait de la recherche de partenaire, visiteraient plus d'arbres, emmenant avec eux une grande quantité de pollen et assurant une pollinisation efficace de ces arbres. Au total, dans le cas de la pollinisation par le téléphore, la récompense offerte par l'arbre agirait en bonne partie indirectement, en attirant les femelles qui ensuite attirent les mâles. Ainsi, la reproduction de l'insecte se retrouve intimement mêlée à celle de l'arbre. A la différence de la stratégie de « tromperie sexuelle des orchidées », où la plante imite l'insecte femelle pour attirer les mâles qui assurent ainsi sa pollinisation (Cozzolino et al 2005 ; Wong et al. 2002), on resterait ici dans le cadre d'un mutualisme (interaction entre deux espèces qui y trouvent un avantage) car le châtaigner sert réellement de lieu de reproduction aux téléphores mâles.

Pour tester ces nouvelles hypothèses issues de mon travail, une de suivi et d'observation de la pollinisation du châtaignier est en cours. Le comportement des téléphores mâles et femelles et les conséquences sur la pollinisation de ces différences sont étudiées directement sur le terrain.

En ce qui concerne l'étude sur les charges en pollen elle-même, elle reste à approfondir. D'une part, des améliorations du protocole sont possibles et souhaitables car les comptages ont été réalisés sur cellule de Mallassez qui fournit une estimation optimale lorsque la concentration cellulaire se situe aux alentours de 250000 cellules par mL, ce qui était loin d'être le cas pour le pollen d'autres espèces, même si les mesures semblent avoir une répétabilité acceptable. D'autre part, la caractérisation génétique de cette charge en pollen doit encore être mise au point. Cela permettrait de quantifier la part d'allo-pollen transportée par l'insecte, indispensable pour la pollinisation chez cette espèce auto-incompatible (Larue et al. 2020). Même si avec les estimations de charges polliniques trouvées sur les insectes récoltés sur les arbres mâles stériles suggèrent que les insectes transportent une proportion faible mais non nulle de pollen d'autres arbres, une analyse du matériel génétique de ces charges polliniques est nécessaire pour le confirmer. Plus fondamentalement, les résultats sur les charges en pollen des téléphores ne suffisent pas à leur attribuer un rôle dans la pollinisation du châtaignier. Pour cela il faudrait étudier expérimentalement l'efficacité de sa pollinisation, c'est-à-dire leur capacité à déposer le pollen viable sur les stigmates fertiles des fleurs femelles (Gaffney 2018).

V) Vers l'analyse génétique de la charge en pollen des insectes

Est-ce que les insectes amènent bien de l'allo-pollen, le seul qui soit efficace pour la pollinisation du châtaignier, sur les fleurs femelles ?

Le métabarcoding de pollen récupéré sur les corps des insectes pollinisateurs a déjà été réalisé plusieurs fois mais seulement pour identifier l'espèce de plantes donneuse de pollen et non l'individu produisant le pollen (Bell et al 2017, Pornon et al 2019).

Pour répondre à cette question j'ai exploré la faisabilité de l'analyse génétique du pollen présent sur le corps des insectes afin de déterminer l'arbre producteur de pollen. L'ADN a dans un premier temps été extrait du pollen en suivant la méthode décrite dans Baksay et al. (2020) et Pornon et al. (2016), avec le kit NucleoSpin Food (Machery-Nagel) en suivant les instructions du kit. L'extraction a été réalisée sur 72 échantillons, correspondant à 24 insectes échantillonnés sur trois arbres de la parcelle A : A58Q, A66Q et A60Q, respectivement de variété Bétizac (astaminé), Marlhac (mésostaminé) et Maridonne (longistaminé), en prenant soin de sélectionner 12 insectes de chaque sexe sur les 24. Le but est donc de déterminer les arbres ayant produit les grains de pollen transportés par les insectes, en comparant les génotypes du pollen à ceux des châtaigniers de la parcelles, tous génotypés préalablement.

Les marqueurs microsatellites nucléaires étudiés sont ceux décrit dans Laurent et al. (2020), plus quelques nouveaux marqueurs hautement polymorphes développés pour l'occasion. Ces nouveaux marqueurs présentent un nombre plus élevés de motifs répétés (plusieurs dizaines contre une quinzaine pour les marqueurs standards) et parfois une juxtaposition de plusieurs motifs différents (jusqu'à trois types de répétitions). Ces caractéristiques particulières devaient garantir un plus grand nombre d'allèles et une plus grande puissance de discrimination, ce qui devra être vérifié par leur génotypage chez les adultes.

Afin de sélectionner les locus les plus informatifs pour l'étude, j'ai étudié leur fréquence allélique dans notre jeu d'individus. Trois scores leurs sont attribués (table 8) selon :

- Le nombre d'allèles partagés entre chaque arbre de la parcelle et les trois arbres cibles, sur lesquels les insectes ont été récoltés. L'idée est de pouvoir repérer les locus permettant de distinguer l'allo-pollen de l'auto-pollen transporté par les insectes. Le score attribué est compris entre zéro et deux pour chaque locus et chaque individu de la parcelle A par rapport à l'arbre cible : 0 indique que l'arbre cible et l'arbre test n'ont aucun allèle en commun, un score de 1 signifie un allèle en commun, et deux que les deux génotypes sont identiques. On fait alors ensuite la moyenne des scores par rapport au trois arbres cible.

- Le nombre d'allèles uniques (trouvés sur un seul individu). L'idée est de déterminer les locus permettant de déterminer de façon univoque l'individu donneur de pollen dans l'échantillon considéré.

Le nombre de données manquantes lors du séquençage. Les locus avec beaucoup de données manquante seront exclus. Parallèlement, de nouveaux marqueurs chloroplastiques ont été développés. Ces marqueurs ont l'avantage d'être haploïdes, avec un seul type de variant par individu, mais ils présentent beaucoup moins de polymorphisme que les marqueurs nucléaires. En effet, en ciblant 32 motifs microsatellites chloroplastiques étudiés par séquençage, on a identifié uniquement 12 haplotypes pour les 95 individus du verger. Nous leur avons attribué les mêmes scores que pour les marqueurs nucléaires, basés sur le nombre d'allèles partagés avec les arbres cibles (variant entre 0 et 1 due à l'haploïdie), et sur les allèles uniques (table 8).

Table 8 : Scores du niveau d'information (nombre d'allèles partagés et taux d'allèles uniques) pour les locus nucléaires et chloroplastiques.

Moyenne des scores d'allèles partagés par locus	Nombre de locus	
	Marqueurs chloroplastiques	Marqueurs nucléaires
< 0,4	26	5
0,4 < x < 1	5	50
>=1	1	51
Pourcentage d'allèles uniques par locus		
>10%	0	13
Entre 7 et 10 %	0	12

Ces scores indiquent que les marqueurs chloroplastiques, même s'ils sont moins informatifs, permettront de bien distinguer l'allo-pollen. En effet 26 locus sur 33 ont un score inférieur à 0,4 ce qui signifie que 67% des arbres (12) ont un haplotype qui diffère des arbres cibles pour ces locus. Leur pollen peut donc être distingué avec l'ADN chloroplastique. Pour les locus nucléaires, 55 locus sur 101 ont un score inférieur à 1, signifiant qu'au moins 50% des individus peuvent être distingués des arbres cibles avec un de ces locus. En les combinant, l'allo-pollen pourra être distingué de l'auto-pollen dans quasiment tous les cas. De plus, les marqueurs nucléaires peuvent permettre de retrouver les arbres donneurs de pollen. En effet si on regarde le nombre d'allèles uniques pour les individus de la parcelle

A, chaque individu, sauf A60Q, possède au moins un allèle unique (table 9), et est donc différenciable des autres arbres. Pour les marqueurs nucléaires, les locus les plus informatifs pour différencier l'allo-pollen sont globalement les mêmes que ceux présentant un grand taux d'allèles uniques. En écartant les locus présentant un grand nombre de données manquantes, nous pouvons donc sélectionner facilement les locus les plus informatifs pour des tests préliminaires.

Table 9 : Nombre d'allèles uniques sur l'ensemble des locus nucléaires pour les arbres de la parcelle A.

Individus	Nombre allèles uniques	Individus	Nombre allèles uniques
A58Os	4	A55S2	2
A60Qs	0	A62Gs	19
A66Qs	4	A62Js	15
A41Ds	3	A62Ms	11
A41Ns	12	A64Cs	3
A42J	12	A65Fs	13
A42Qs	11	A65Hs	11
A44Ks	16	A68Ks	17
A45Ds	1	A71Rs	7
A45E	9	A73Fs	3
A55S1	11		

Comme nous travaillons sur des mélanges de pollen et que les motifs SSR sont difficiles à interpréter après séquençage, à cause des erreurs de PCR (« stuttering »), la méthode MIPSTR pour *Molecular Inversion Probe for Short Tandem Repeat* ; Hiatt et al. 2013, Carlson et al. 2015, Tao et al. 2020) paraît la méthode la plus adaptée. Cette méthode permet de s'affranchir du bruit de fond généré par les artefacts de PCR et de séquençage (Salk et al. 2018). Les sondes sont « taguées », ce qui permet de pouvoir distinguer les erreurs de la Taq polymérase qui sont particulièrement fréquentes lors de l'amplification de motifs répétés.

Le design des sondes a été effectué avec le progiciel Mipgen (implémenté dans C++) (O'Roak et al. 2012), chaque sonde MIP permettant de capturer une zone de 250 nucléotides au total. Pour résumer, ces sondes ont cinq parties : deux bras de ligation de 16 à 20 nucléotides correspondants aux séquences flanquant le locus étudié ; deux zones d'hybridation des amorces PCR, communes à toutes

les sondes permettant l'ajout des barcodes et adaptateurs nécessaires au séquençage ; et enfin un tag de huit nucléotides généré aléatoirement constituant le motif unique. Nous avons sélectionné seulement les sondes présentant un score (donné par MIPgen) supérieur à 0,7. Toutes les sondes ont ensuite été validées individuellement via le logiciel IVG. L'objectif est de vérifier que le motif SSR voulu est bien présent en comptant au minimum 20 nucléotides de marge entre les bras de ligation. Au total, 100 sondes ont ainsi été sélectionnées : 80 pour les locus SSR décrits par Laurent et al. 2020, et 20 pour les locus hautement polymorphes. Pour les marqueurs chloroplastiques, les sondes ne sont pas encore développées. L'utilisation des sondes se fait ensuite en plusieurs étapes : capture, ligation, et extension. Nous avons testé différents protocoles existants dans la littérature (Hiatt et al. 2013, Carlson et al. 2015, Tao et al. 2020), mais ces tests se sont révélés pour le moment non concluants, et la mise au point se poursuit au laboratoire.

Remerciements :

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire.

Je voudrais dans un premier temps remercier mes encadrants (Rémy, Olivier et Clément), pour leur patience, leur disponibilité, les relectures de ce mémoire et surtout pour leurs conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je remercie également Grégoire et Bérengère qui ont effectué les mesures de taille et de poids des insectes nécessaires à une grande partie des analyses.

Enfin je voudrais exprimer ma gratitude à toute l'équipe de Biogeco et de la PGTB, notamment Céline et Benjamin qui ont pris le temps de superviser et d'expliquer quelques expérimentations.

Bibliographie :

Andres, K. J., Sethi, S. A., Lodge, D. M., & Andrés, J. Nuclear eDNA estimates population allele frequencies and abundance in experimental mesocosms and field samples. *Molecular ecology*.

Baksay, S., Pornon, A., Burrus, M., Mariette, J., Andalo, C., & Escaravage, N. (2020). Experimental quantification of pollen with DNA metabarcoding using ITS1 and trnL. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9.

Bell, K. L., Fowler, J., Burgess, K. S., Dobbs, E. K., Gruenewald, D., Lawley, B., ... & Brosi, B. J. (2017). Applying pollen DNA metabarcoding to the study of plant-pollinator interactions. *Applications in plant sciences*, 5(6), 1600124.

Bennett, L., Oldoni, F., Long, K., Cisana, S., Madella, K., Wootton, S., ... & Podini, D. (2019). Mixture deconvolution by massively parallel sequencing of microhaplotypes. *International journal of legal medicine*, 133(3), 719-729.

Boyle, E. A., O'Roak, B. J., Martin, B. K., Kumar, A., & Shendure, J. (2014). MIPgen: optimized modeling and design of molecular inversion probes for targeted resequencing. *Bioinformatics*, 30(18), 2670-2672.

Carlson, K. D., Sudmant, P. H., Press, M. O., Eichler, E. E., Shendure, J., & Queitsch, C. (2015). MIPSTR: a method for multiplex genotyping of germline and somatic STR variation across many individuals. *Genome research*, 25(5), 750-761.

Cozzolino, S., & Widmer, A. (2005). Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception?. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(9), 487-494.

Després, L. (2003). Sex and pollen: the role of males in stabilising a plant-seed eater pollinating mutualism. *Oecologia*, 135(1), 60-66.

Fitton, M. G. (1973). Studies on the biology and ecology of cantharidae (coleoptera).

Gaffney, A., Bohman, B., Quarrell, S. R., Brown, P. H., & Allen, G. R. (2018). Frequent insect visitors are not always pollen carriers in hybrid carrot pollination. *Insects*, 9(2), 61.

Hardenbol, P., Banér, J., Jain, M., Nilsson, M., Namsaraev, E. A., Karlin-Neumann, G. A., ... & Davis, R. W. (2003). Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes. *Nature biotechnology*, 21(6), 673-678.

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.

Hiatt, J. B., Pritchard, C. C., Salipante, S. J., O'Roak, B. J., & Shendure, J. (2013). Single molecule molecular inversion probes for targeted, high-accuracy detection of low-frequency variation. *Genome research*, 23(5), 843-854.

Larue, C., Austruy, E., Basset, G., & Petit, R. J. (2021). Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea* spp.): an integrated approach. *Botany Letters*, 1-25.

Laurent, B., Larue, C., Chancerel, E., Guichoux, E., Petit, R. J., Barreneche, T., ... & Lepais, O. Microhaplotype genotyping-by-sequencing of 98 highly polymorphic markers in three chestnut tree species.

Lepais, O., Chancerel, E., Boury, C., Salin, F., Manicki, A., Taillebois, L., ... & Guichoux, E. (2020). Fast sequence-based microsatellite genotyping development workflow. *PeerJ*, 8, e9085.

Magis, N. (1963). La structure abdominale des espèces du genre *Malthodes* Kiesenwetter (1982):(Coleoptera, Cantharidae, Malthinini). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 32(7/8), 498-515.

Matsuki, Y., Tateno, R., Shibata, M., & Isagi, Y. (2008). Pollination efficiencies of flower-visiting insects as determined by direct genetic analysis of pollen origin. *American Journal of Botany*, 95(8), 925-930.

- O’Roak, B. J., Vives, L., Fu, W., Egertson, J. D., Stanaway, I. B., Phelps, I. G., ... & Shendure, J. (2012). Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science*, 338(6114), 1619-1622.
- Pornon, A., Escaravage, N., Burrus, M., Holota, H., Khimoun, A., Mariette, J., ... & Andalo, C. (2016). Using metabarcoding to reveal and quantify plant-pollinator interactions. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.
- Pornon, A., Baksay, S., Escaravage, N., Burrus, M., & Andalo, C. (2019). Pollinator specialization increases with a decrease in a mass-flowering plant in networks inferred from DNA metabarcoding. *Ecology and evolution*, 9(24), 13650-13662.
- Rodwell, L. E., Day, J. J., Foster, C. W., & Holloway, G. J. (2018). Daily survival and dispersal of adult *Rhagonycha fulva* (Coleoptera: Cantharidae) in a wooded agricultural landscape. *European Journal of Entomology*, 115, 432-436.
- Shivanna, K. R., & Tandon, R. (2014). *Reproductive ecology of flowering plants: a manual* (pp. 107-123). New Delhi: Springer India
- Salk, J. J., Schmitt, M. W., & Loeb, L. A. (2018). Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations. *Nature Reviews Genetics*, 19(5), 269.
- Smith, G. P., Bronstein, J. L., & Papaj, D. R. (2019). Sex differences in pollinator behavior: patterns across species and consequences for the mutualism. *Journal of Animal Ecology*, 88(7), 971-985.
- Tao, L., Raz, O., Marx, Z., Gosh, M., Huber, S., Greindl-Junghans, J., ... & Shapiro, E. (2020). Retrospective cell lineage reconstruction in Humans using short tandem repeats. *bioRxiv*, 191296.
- Wong, B. B., & Schiestl, F. P. (2002). How an orchid harms its pollinator. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1500), 1529-1532.

Web

- Châtaignier - CNPF - Centre national de la propriété forestière.* , 2020 (s. d.). CNPF - Centre national de la propriété forestière. <https://www.cnpf.fr/n/chataignier/n:913>
- Vergers moderne de châtaignier, 2017.* (s. d.). Invenio. <https://www.invenio-fl.fr/experimentation-chataigne/syntheses-et-rapports-fam/note-de-synthese-verger-de-chataignier>
- FAO.* ,2021(s. d.). <http://www.fao.org/pollination/fr/>. <https://www.fao.org/pollinisation/fr/>
- rcompagnon.* (s. d.). R Handbook 2015 : Regression for Count Data (rcompanion.org). https://rcompanion.org/handbook/J_01.html

Résumé

Le téléphore fauve, un petit coléoptère de la famille des Cantharidés, est l'insecte le plus abondant sur les fleurs de châtaigner. Le présent travail sur l'analyse des grains de pollen présents sur le corps de 300 téléphores fauves a permis de montrer que cet insecte est très fidèle à cet arbre (il transporte peu de pollen d'autres espèces de plantes) et qu'il est très efficace (plus de 67 000 grains de pollen de châtaigner en moyenne sur un insecte, soit l'équivalent du contenu d'au moins 13 anthères). Les mâles du téléphore fauve présentent une charge pollinique beaucoup plus élevée que celle des femelles. Cette différence entre les sexes pourrait s'expliquer par la plus grande capacité de dispersion des mâles. Cette hypothèse est confortée par une étude morphométrique (mesures de taille et de poids) des insectes, montrant que les mâles ont une charge alaire plus faible et des pattes proportionnellement plus grandes que les femelles. En outre, les téléphores femelles les plus lourdes ont une charge en pollen particulièrement réduite, en accord avec l'hypothèse que l'aptitude à la dispersion affecte la charge en pollen. Cette étude, ainsi que le sex-ratio fortement biaisé en faveur des mâles, nous amène à proposer l'hypothèse d'un rôle prédominant des téléphores mâles dans la pollinisation du châtaigner. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait déterminer si les insectes transportent bien du pollen issu d'autres arbres, le seul susceptible de féconder les fleurs femelles chez cet arbre auto-incompatible. Pour cela une approche innovante de barcoding du pollen présent a été expérimentée, dont les premiers résultats seront présentés.

Abstract

Rhagonycha fulva, the red soldier beetle, is the most commonly observed insect on chestnut flowers. In this work, I monitored the pollen load of 300 insects. The results show that the red soldier beetle is a faithful pollinator of chestnut: insects collected on chestnut carry little pollen from other plant species. Moreover, it is an effective pollinator considering the large pollen load detected (on average over 67 000 pollen grains per insect, the equivalent of the content of at least 13 anthers). The pollen load of male insects is much higher than that of females. This difference could be a consequence of their higher dispersal. A morphometric study of the insects showed that males have reduced wing loading and proportionally longer legs than females, strengthening this hypothesis. This, along with the male-biased sex-ratio of soldier beetles, suggests that male red soldier beetles play a predominant role in chestnut pollination. To confirm this hypothesis, it would be important to investigate if insect actually carry outcrossed pollen, the only pollen that can fertilize female flowers in this self-incompatible species. For this purpose, an innovative technique of barcoding has been attempted, whose first results will be presented.