

Connaissance du châtaignier #3



Le rôle clé des insectes sauvages dans la pollinisation du châtaignier

Clément Larue et Rémy Petit



INRAE



RÉGION
Nouvelle-
Aquitaine

anr® *Invenio*

Comment les châtaigniers sont-ils pollinisés ? Par le vent, par les insectes ou par les deux ? Depuis près de 150 ans, cette question restait sans réponse. L'énorme production de minuscules grains de pollen transportés par le vent sur de longues distances semble indiquer une pollinisation par le vent. Cependant, la couleur vive des fleurs, la forte odeur spermatique émise par les arbres lors de la floraison et des grains de pollen collants sont caractéristiques de la pollinisation par les insectes. Nous résumons ici les résultats de plus de cinq années de recherche sur la pollinisation du châtaignier afin de répondre à cette question. Le mystère de la pollinisation du châtaignier s'éclaircit...

Une question ancienne

La biologie du châtaignier est assez bien étudiée, mais son mode de pollinisation est longtemps resté obscur. Le châtaignier a d'abord été considéré comme pollinisé par le vent^{1,2} mais depuis la fin du 19ème siècle, cette hypothèse a été remise en question³ : «*Quelle serait la signification de cette puissante odeur des fleurs si la fécondation croisée était uniquement due au vent ?*». Distinguer les plantes pollinisées par le vent de celles pollinisées par les insectes n'est pas aussi simple qu'il n'y paraît au premier abord⁴. Pourtant, la pollinisation mixte par le vent et les insectes, appelée ambophilie, devrait être très rare⁵, car les plantes devraient s'adapter à leur principal agent pollinisateur.

Pour établir le mode de pollinisation du châtaignier sur des bases solides, il est nécessaire de réaliser des expériences d'exclusion des insectes pollinisateurs. Comme l'a souligné Darwin⁶, des précautions expérimentales très strictes sont nécessaires. Si la production de fruits s'effondre lorsque les insectes ne peuvent plus accéder aux fleurs femelles, cela indiquera l'entomophilie. Toutefois, il faudrait idéalement combiner ces expériences d'exclusion à des observations directes pour identifier les insectes visitant les fleurs et valider leur rôle dans la pollinisation. Dans le cas du châtaignier, qui possède des fleurs mâles et femelles distinctes, les insectes doivent visiter les deux types de fleurs pour assurer la pollinisation : fleurs mâles pour récupérer le pollen et fleurs femelles ensuite pour y déposer le pollen. Enfin, une compréhension complète de la pollinisation suppose de bien comprendre comment la structure des fleurs et la phénologie de la floraison facilite la pollinisation par les insectes.

Comment fonctionne la pollinisation ?

Le châtaignier possède deux types d'inflorescences : des chatons mâles unisexués et des chatons bisexués. Les nombreux chatons mâles unisexués ne portent que des fleurs mâles. En revanche, les chatons bisexués, plus rares, possèdent un chaton mâle associé à une ou deux inflorescences femelles. Les fleurs mâles des chatons unisexués et bisexués sont similaires et produisent un pollen de fertilité équivalente⁷, ce qui soulève la question de leur rôle respectif dans la pollinisation. Chaque fleur femelle possède six à huit styles, avec à l'extrémité de chaque style un très petit stigmate en forme de cratère, rendant difficile la capture de pollen fortement dilué dans l'air. Comment et pourquoi les insectes pollinisent-ils ces fleurs femelles dépourvues de récompense ?

Les châtaigniers sont duodichogames, c'est-à-dire qu'ils ont deux phases distinctes d'émission de pollen au cours de chaque épisode de floraison⁸. Les fleurs mâles des chatons unisexués fleurissent en premier, à la fin du mois de mai ou au début du mois de juin, et émettent du pollen en très grande quantité. Environ 15 jours plus tard, la partie mâle des chatons bisexués fleurit à son tour, donnant lieu à une seconde phase d'émission de pollen, beaucoup plus petite, représentant environ 3% de la quantité totale de pollen émise par l'arbre⁴. Les deux phases d'émission de pollen couvrent la longue période de réceptivité des fleurs femelles, qui dure près de trois semaines à l'échelle de l'arbre, mais qui atteint son maximum 10 à 15 jours après le début de la floraison^{9,10}. Quel est l'avantage adaptatif de cette floraison très inhabituelle ?

Le châtaignier est pollinisé par les insectes

En raison de l'apparente rareté des visites d'insectes sur des fleurs femelles peu attrayantes, le châtaignier a longtemps été considéré comme étant principalement pollinisé par le vent ¹¹⁻¹⁴, les insectes étant supposés jouer un rôle modeste ¹⁵. Pour quantifier précisément le rôle des insectes dans la pollinisation du châtaignier, le taux de remplissage des bogues (c'est-à-dire le pourcentage de fleurs femelles donnant un fruit) de branches témoins peut être comparé à celui des branches recouvertes par des filets anti-insectes. Les fleurs femelles témoins, en pollinisation libre, sont accessibles au pollen transporté par le vent et par les insectes, tandis que les fleurs femelles recouvertes de filets ne sont plus accessibles aux insectes mais restent accessibles au pollen transporté dans l'air. Nous avons trouvé des mentions de cinq expériences d'exclusion de pollinisateurs menées sur des châtaigniers ^{13,14,16-18}. Dans toutes ces études, les inflorescences femelles des branches témoins avaient un taux de remplissage beaucoup plus élevé que les fleurs femelles enfermées dans des filets ⁴. Nous avons mené une nouvelle expérience d'exclusion des insectes en 2019 sur différents cultivars de châtaignier dont 'Marigoule', 'Bouche de Bétizac', 'Bellefer' et 'Jeanette'. Lorsque les insectes n'ont plus accès aux fleurs femelles, le taux de remplissage chute drastiquement, confirmant ainsi le rôle prépondérant des insectes dans la pollinisation du châtaignier.

Ces nouveaux travaux ⁴ ont remis en question la croyance fortement ancrée selon laquelle les châtaigniers sont principalement pollinisés par le vent ^{16,19,20}. Pour confirmer ces résultats, nous avons répété les expériences d'exclusion des insectes pendant plusieurs années, sur différents sites, en optimisant le protocole ⁶. Avec le nouveau protocole, le taux de remplissage des branches recouvertes de filets est réduit en moyenne de 94% par rapport aux témoins ²¹ (**Figure 1**). Le châtaignier peut donc être formellement classé parmi les espèces entomophiles ²².

Une pollinisation assurée par les insectes sauvages

Afin d'identifier les pollinisateurs impliqués, nous avons réalisé un suivi photographique des insectes en 2019 et 2021. Lors de chaque relevé, tous les insectes visitant chaque arbre étudié ont été photographiés et identifiés. Nous avons classé comme pollinisateurs uniquement les espèces d'insectes visitant régulièrement les fleurs mâles et femelles du châtaignier.

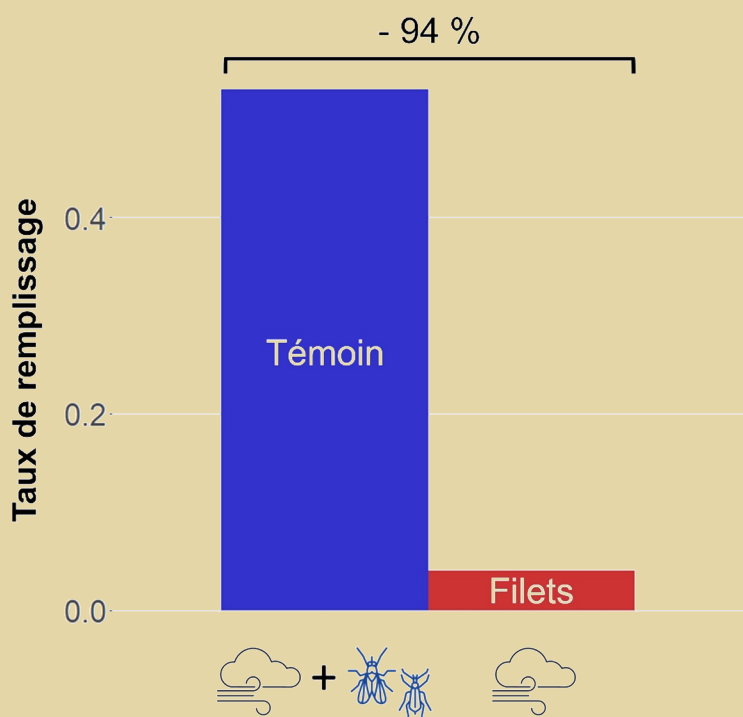


Figure 1: Le taux de remplissage des bogues correspond au pourcentage de fleurs qui donnent des fruits. Lorsque les insectes n'ont plus accès aux fleurs femelles, le taux de remplissage s'effondre, confirmant ainsi que le châtaignier est entomophile.



Figure 2 : Les mouches à calyptres (A, B et C) et les coléoptères (D, E et F) sont les pollinisateurs du châtaigniers les plus abondant, ils visitent à la fois les fleurs mâles et les fleurs femelles du châtaignier. Les téléphores fauves (D) sont les coléoptères les plus fréquents dans les vergers, tandis que les œdémères nobles (E) et les cistèles jaunes (F) sont moins nombreux. Même si les mouches à calyptres sont plus rares, elles transportent du pollen de meilleure



qualité que les coléoptères et sont donc les insectes pollinisateurs les plus efficaces. Les abeilles, domestiques (G) aussi bien que sauvages (I), ainsi que les bourdons (H) visitent les fleurs mâles du châtaigniers, mais pas les fleurs femelles : ce sont de simples visiteurs. De nombreuses autres espèces d'insectes viennent récupérer du pollen et du nectar sur les fleurs mâles du châtaignier pour leur alimentation : des papillons (J), des éristales (K) et des syrphes (L).

En 2019, nous avons inventorié 4203 arthropodes sur 16 châtaigniers dont 66 interactions avec des fleurs femelles en près de 67 heures d'observation⁴. Les coléoptères, principalement le téléphore fauve, et les diptères, principalement les mouches à calyptres (type mouche domestique), visitent les fleurs mâles et femelles, et sont donc des pollinisateurs du châtaignier (**Figure 2**). Par contre, les abeilles visitent les fleurs mâles mais pas les fleurs femelles du châtaignier, elles sont donc de simple visiteuses.

Nous avons répété ce suivi des insectes en 2021, en enregistrant avec précision la phénologie de la floraison. Cette fois-ci, nous avons identifié 4051 arthropodes, dont 239 ont interagi avec les fleurs femelles au cours d'environ 35 heures d'observations²³. Les coléoptères (en particulier le téléphore fauve) et les mouches à calyptres sont les insectes les plus abondants sur les fleurs mâles et femelles du châtaignier, et donc les pollinisateurs les plus importants (**Figure 2**). En revanche, les syrphes et les abeilles (domestiques ou sauvages) ne visitent que rarement les fleurs femelles du châtaignier et ne contribuent donc pas à sa pollinisation. La plupart des interactions avec les fleurs femelles ont eu lieu pendant la deuxième phase d'émission du pollen (**Figure 3**). Même si les taux de visite des téléphores fauves et des mouches à calyptres sont faibles, ils sont suffisants pour que les fleurs femelles des arbres étudiés soient visitées en moyenne plusieurs fois, grâce à leur longue période de réceptivité.

Un fonctionnement complexe

Chez le châtaignier, la partie mâle des chatons bisexués joue en fait un rôle clé dans la pollinisation par les insectes : elle attire les insectes à proximité des fleurs femelles, augmentant ainsi leurs chances d'être visitées et pollinisées²³. Les insectes concernés - coléoptères et mouches à calyptres - marchent fréquemment sur les rameaux et grimpent sur les inflorescences femelles. Les nombreux et minuscules grains de pollen présents sur leurs pattes ou leur corps sont déposés sur les stigmates situés à l'extrémité des styles des fleurs femelles. L'orientation des inflorescences femelles joue un rôle clé dans la pollinisation : les inflorescences femelles orientées vers le haut sont visitées plus fréquemment par les coléoptères et les mouches que celles orientées vers le côté ou vers le bas.

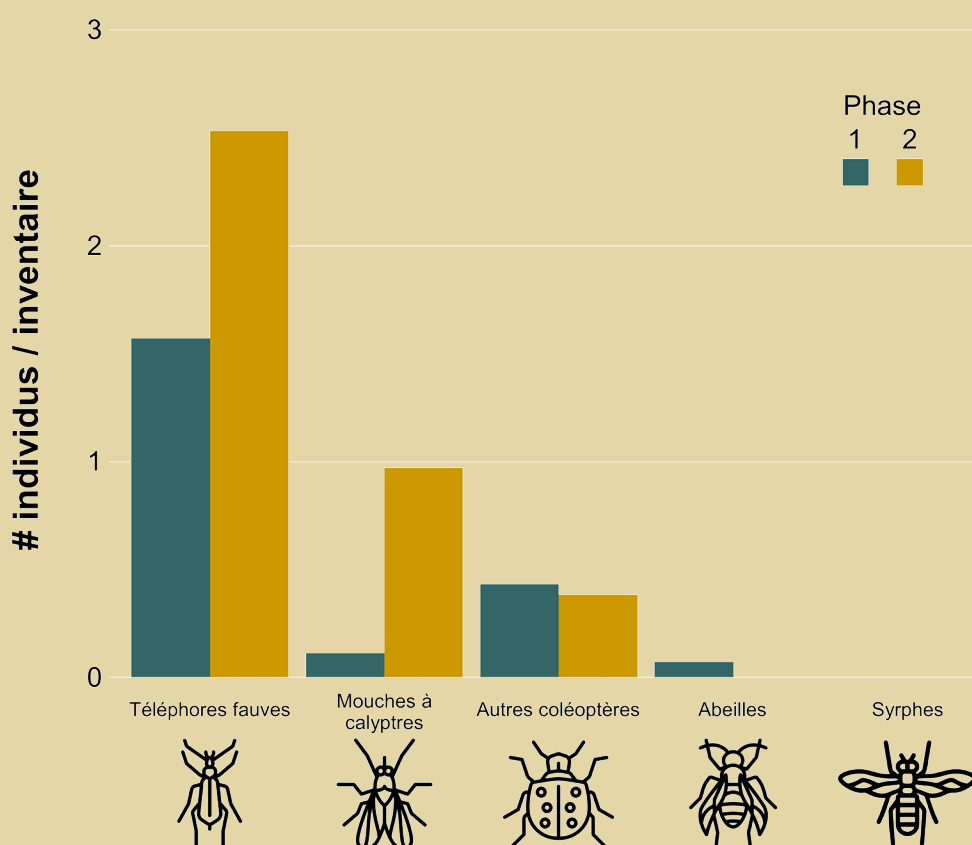


Figure 3 : Seuls les insectes pollinisateurs sauvages visitent régulièrement les fleurs femelles des châtaigniers (barres aux couleurs plus foncées). Ces visites ont lieu majoritairement lors de la seconde phase d'émission de pollen, c'est-à-dire lorsque les inflorescences mâles des chatons bisexués sont en fleurs (barres marron). Les coléoptères (majoritairement des téléphores fauves) et les mouches à calyptres sont les pollinisateurs les plus abondants. Les abeilles et les syrphes ne visitent quasiment pas les fleurs femelles.

Seules les fleurs mâles produisent des récompenses pour les insectes : du nectar et, dans le cas des arbres mâles-fertiles, du pollen. Contrairement aux fleurs femelles, le réceptacle des fleurs mâles, qui sécrète le nectar, fluoresce en réponse au rayonnement UV, ce qui rend ces fleurs mâles facilement perceptibles par les insectes (**Figure 4**). Les fleurs femelles sont physiquement plus proches des inflorescences mâles des chatons bisexués que des inflorescences mâles des chatons unisexués. Les inflorescences mâles des chatons bisexués jouent ainsi un rôle prépondérant dans la pollinisation des fleurs femelles, tout en limitant l'autopollinisation en raison de la libération tardive et de la quantité réduite de pollen. C'est important car les ovules autopollinisés avortent en raison de mécanismes d'auto-incompatibilité agissant tardivement ^{24,25}.

L'odeur spermatique des fleurs de châtaignier est due à des composés azotés, notamment la 1-pyrroline, connue pour attirer les mouches ²⁶. De même, le nectar de châtaignier, produit à la base des fleurs mâles, contient une faible proportion de saccharose (moins de 15% ²⁷), une valeur caractéristique des plantes pollinisées par les mouches ²⁸. Notre découverte que les inflorescences du châtaignier sont adaptées à la pollinisation par les insectes marcheurs conforte l'hypothèse que les châtaigniers sont adaptés à la pollinisation soit par les coléoptères soit par les mouches. Toutefois, en forêt, les mouches sont abondantes mais les coléoptères sont beaucoup plus rares ⁴. Les mouches à calyptres sont donc les pollinisateurs les plus constants. De plus, l'étude des comportements des insectes visitant les fleurs femelles montre que les mouches volent plus fréquemment que les coléoptères. En visitant potentiellement un plus grand nombre d'arbres, les mouches à calyptres devraient donc transporter un mélange de pollen plus diversifié et ainsi mieux assurer la fécondation croisée ⁴. Les inflorescences de châtaignier sont donc caractérisées par une série d'adaptations à la pollinisation par les mouches.

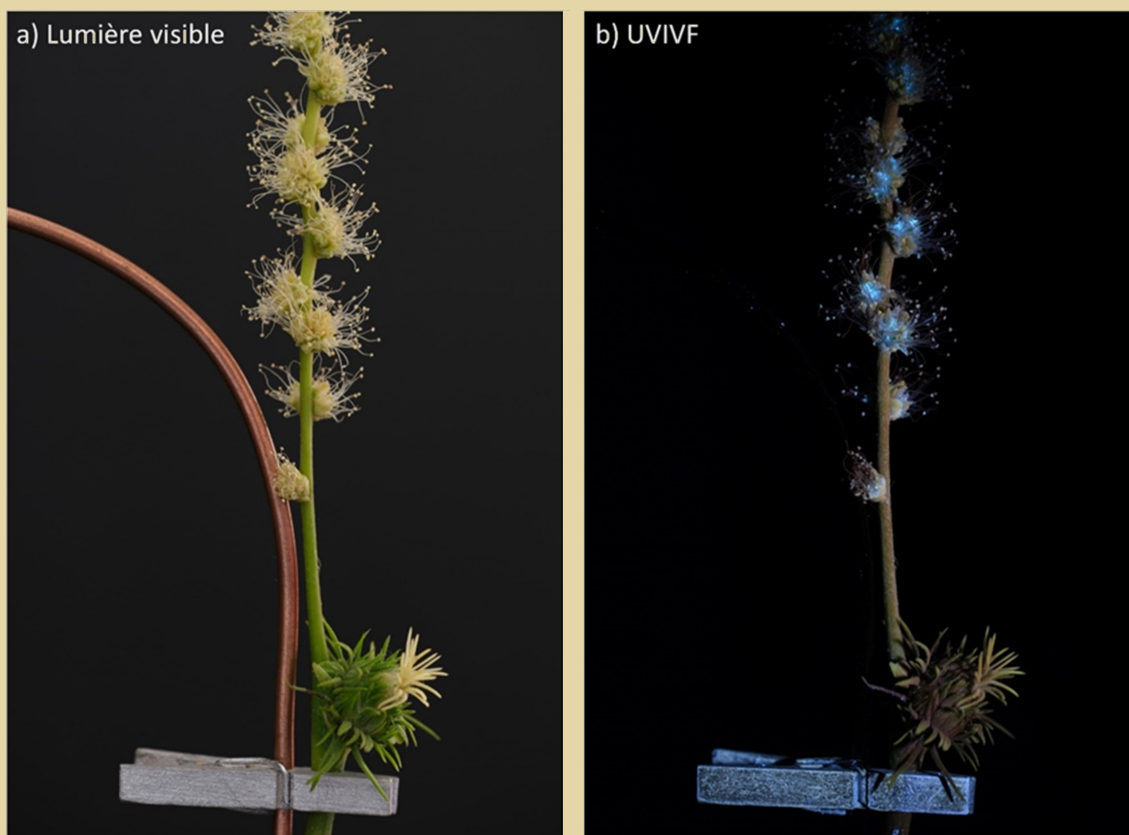


Figure 4 : Photographies d'un chaton bisexué. En lumière visible, les fleurs mâles et femelles du châtaignier apparaissent jaunes (a). Sous lumière ultraviolette, les fleurs mâles et notamment leur base nectarifère apparaissent vivement colorées, tandis que les fleurs femelles ne fluorescent pas (b).

Conclusion

Nos travaux mettent fin à 150 ans d'incertitudes. Le châtaignier n'est ni pollinisé par le vent, ni ambophile. Il est entièrement pollinisé par des insectes sauvages : des mouches à calyptres surtout. Par conséquent, la plantation d'arbres donneurs de pollen dans le sens du vent ou l'utilisation de ruches d'abeilles domestiques dans les vergers de châtaigniers n'améliorera pas la pollinisation et la production de fruits. Les pollinisateurs du châtaignier, en visitant les inflorescences mâles, collectent du pollen qu'ils déposent ensuite en grimpant sur les fleurs femelles²⁹. La rareté apparente des interactions entre insectes et fleurs femelles rapportée dans la littérature est largement due au fait que les observateurs examinaient les arbres en fleurs à un stade trop précoce. La longue période de réceptivité des fleurs femelles compense la faible fréquence des visites d'insectes, mais celle-ci est suffisamment élevée pour que toutes les fleurs femelles soient visitées plusieurs fois par les pollinisateurs. Les recherches phylogénomiques récentes sur les Fagaceae montrent que la pollinisation par les insectes est ancestrale. La pollinisation par le vent serait apparue plus récemment, il y a environ 56 millions d'années, lors de l'apparition des chênes, proches cousins des châtaigniers³⁰.

Le châtaignier semble être bien adapté à la pollinisation par les mouches à calyptres. Or les besoins de ces pollinisateurs sont encore mal connus. Il faudrait combler cette lacune pour optimiser la pollinisation dans les vergers de châtaigniers. Les mesures agri-environnementales adaptées aux abeilles ne suffiront pas. Chez les diptères, les besoins des larves et des adultes sont souvent très différents³¹. Les stratégies de conservation de ces pollinisateurs devraient donc prendre en compte les besoins spécifiques des adultes et des larves de ces insectes (ex. matières organiques humides, compost, fumier, etc.), et pas se focaliser uniquement sur les ressources florales, comme dans le cas des abeilles.

Références

- [1] Delpino F. *Ulteriori Osservazioni Sulla Dichogamia Nel Regno Vegetale* [Further Observations on Dichogamy in the Vegetable Kingdom]. Buchausgabe; 1868.
- [2] Sprengel C. *Die Nützlichkeit Der Bienen Und Die Notwendigkeit Der Bienenzucht, von Einer Neuen Seite Dargestellt* [The Usefulness of Bees and Necessity of Apiculture]. Pfenningdsdorff; 1811.
- [3] Meehan T. On sex in *Castanea Americana*. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 1879;31(2):165-167.
- [4] Larue C, Austruy E, Basset G, Petit RJ. Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea* spp.): an integrated approach. *Bot Lett*. 2021;168(3):348-372.
- [5] Stebbins GL. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1970;1(1):307-326.
- [6] Darwin C. *The Effects of Cross and Self Fertilisation in the Vegetable Kingdom*. John Murray; 1876.
- [7] Silva DM, Zambon CR, Techio VH, Pio R. Floral characterization and pollen germination protocol for *Castanea crenata* Siebold & Zucc. *South African Journal of Botany*. 2020;130:389-395.
- [8] Stout AB. Dichogamy in flowering plants. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 1928;55(3):141-153.
- [9] Shi Z, Stösser R. Reproductive biology of Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume). *Europ J Hort Sci*. 2005;70(2):96-103.
- [10] Shimura I, Yasuno M, Otomo C. Studies on the breeding behaviours of several characters in chestnuts. II. Effects of pollination time on number of nuts in the burr. *Journal of Japanese breeding*. 1971;(21):77-80.
- [11] Giovanetti M, Aronne G. Honey bee interest in flowers with anemophilous characteristics: first notes on handling time and routine on *Fraxinus ornus* and *Castanea sativa*. *Bulletin of Insectology*. 2011;64(1):77-82.
- [12] Hasegawa Y, Suyama Y, Seiwa K. Variation in pollen-donor composition among pollinators in an entomophilous tree species, *Castanea crenata*, revealed by single-pollen genotyping. *PLOS ONE*. 2015;10(3):e0120393.
- [13] Johnson GP. Revision of *Castanea* sect *Balanocastanea* (Fagaceae). *Journal of the Arnold Arboretum*. 1988;69(1):25-49.
- [14] Zirkle C. *The Effect of Insects on Seed Set of Ozark Chinquapin*, *Castanea Ozarkensis*. Master Thesis. University of Arkansas; 2017. <https://scholarworks.uark.edu/etd/1996>
- [15] Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc B*. 2007;274(1608):303-313. doi:10.1098/rspb.2006.3721
- [16] Clapper RB. Chestnut breeding, techniques and results. I. Breeding Material and Pollination Techniques. *The Journal of Heredity*. 1954;3(45):8.
- [17] de Oliveira D, Gomes A, Ilharco FA, Manteigas AM, Pinto J, Ramalho J. Importance of insect pollinators for the production in the chestnut, *Castanea sativa*. *Acta Horticulturae*. 2001; (561):269-273. doi:10.17660/ActaHortic.2001.561.40
- [18] Manino A, Patetta A, Marletto F. Investigations on chestnut pollination. *Acta Horticulturae*. 1991;(288):335-339. doi:10.17660/ActaHortic.1991.288.54
- [19] Abrol DP. Nuts. In: Abrol DP, ed. *Pollination Biology, Vol.1: Pests and Pollinators of Fruit Crops*. Springer International Publishing; 2015:177-207.
- [20] Breisch H. *Châtaignes et Marrons*. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes; 1995.
- [21] Petit RJ, Larue C. Confirmation that chestnuts are insect-pollinated. *Botany Letters*. 2022;0(0):1-5.
- [22] Rodger JG, Bennett JM, Razanajatovo M, Knight TM, van Kleunen M, Ashman TL, et al. Widespread vulnerability of flowering plant seed production to pollinator declines. *Sci Adv*. 2021;7(42):eabd3524.
- [23] Pauly G, Larue C, Petit RJ. Adaptive function of duodichogamy: Why do chestnut trees have two pollen emission peaks? *Am J Bot*. Published online 2023.
- [24] Larue C, Klein EK, Petit RJ. Sexual interference revealed by joint study of male and female pollination success in chestnut. *Molecular Ecology*. 2023;32(5):1211-1228.
- [25] Xiong H, Zou F, Guo S, Yuan D, Niu G. Self-sterility may be due to prezygotic late-acting self-incompatibility and early-acting inbreeding depression in Chinese chestnut. *J Am Soc Hortic Sci*. 2019;144:172-181.
- [26] Zhang X, Ji Y, Zhang Y, Liu F, Chen H, Liu J, et al. Molecular analysis of semen-like odor emitted by chestnut flowers using neutral desorption extractive atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2019;411(18):4103-4112.
- [27] Kim MJ, Lee U, Park Y. 'Jahong': A new indigenous Korean chestnut cultivar with reddish burrs. *horts*. 2014;49(12):1588-1589.
- [28] Abrahamczyk S, Kessler M, Hanley D, Karger DN, Müller MPJ, Knauer AC, et al. Pollinator adaptation and the evolution of floral nectar sugar composition. *J Eval Biol*. 2017;30(1):112-127.
- [29] Faegri K, Van Der Pijl L. *Principles of Pollination Ecology*. Elsevier; 1979.
- [30] Zhou BF, Yuan S, Crowl AA, Liang YY, Shi Y, Chen XY, et al. Phylogenomic analyses highlight innovation and introgression in the continental radiations of Fagaceae across the Northern Hemisphere. *Nat Commun*. 2022;13(1):1320.
- [31] Davis AE, Bickel DJ, Saunders ME, Rader R. Crop-pollinating Diptera have diverse diets and habitat needs in both larval and adult stages. *Ecological Applications*. Published online May 24, 2023:e2859.