

ETUDE DES PARAMETRES CHIMIQUES IMPLIQUES DANS LA POLLINISATION DU TOURNESOL PAR LES ABEILLES EN PRODUCTION DE SEMENCES HYBRIDES.

M.H. Pham-Delègue* ; C. Masson* ; A. Bonjean** ; P. Etievant*** ; R. Marilleau* ;

* Laboratoire de Neurobiologie Sensorielle de l'Insecte CNRS-INRA (UA 483)
Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes Sociaux,
91440 Bures sur Yvette - France

** Union des Coopératives de Semences de Tournesol U.C.S.T.,
12, rue Roger Bacon, Paris - France.

*** Laboratoire de Recherches sur les Arômes, INRA, 21034 Dijon - France.

SUMMARY

In this work, a study of the role of plant chemicals likely to be involved in honeybees foraging behaviour among parental lines of the hybrids MARIANNE and MIRASOL, was set up. This study was carried out along two years, by a coupled behavioural and chemical analysis :

Behavioural observations set up in controlled conditions of pollination under tunnels, allowed to point out that honeybees were differentially distributed according to the genotypes. Chemical basis of such a discrimination were examined.

- at the level of nectars : glucidic composition of nectars collected by micro-pipets was analyzed by gas chromatography (G.C.). Quantitative and qualitative differences, particularly for sucrose amounts, appeared among studied genotypes.

- at the level of aroma : volatiles from leaving heads were trapped by "head space" method ; statistical analysis of chromatographic profiles obtained from gas chromatography, allowed to point out significant qualitative and quantitative differences among aroma from different plant genotypes and along flowering

Thus foragers differential distribution among sunflower lines was based on qualitative and quantitative differences among chemicals constituting the food reward (nectars) and volatiles (aroma) which allowed foragers orientation towards the best food sources.

INTRODUCTION.

La production de semences hybrides de tournesol, fondée sur la découverte de la stérilité mâle-cytoplasmique (LECLERCQ, 1969) nécessite un transport de pollen par les insectes - principalement l'abeille domestique - de la lignée parentale mâle restauratrice de fertilité (lignée mâle-fertile) à la lignée femelle à stérilité mâle cytoplasmique (lignée mâle-stérile). Or des différences d'attractivité des lignées parentales vis-à-vis des abeilles butineuses peuvent conduire à une fécondation insuffisante de la lignée maternelle (Parker, 198

L'objet du travail présenté dans cet exposé a été :

- de quantifier l'attractivité pour les abeilles des lignées parentales de deux hybrides commerciaux, MARIANNE et MIRASOL dont les rendements en production de semences diffèrent sensiblement (environ 5-6 qx/ha pour les semences de MARIANNE et 10-13 qx/ha pour celles de MIRASOL).
- d'étudier le rôle des médiateurs chimiques produits par le végétal et utilisés par l'abeille dans ses choix alimentaires : il s'agit d'une part des arômes, substances volatiles émises par la plante et qui sont responsables de l'orientation à distance de l'insecte vers la plante, et d'autre part des nectars (le pollen de tournesol étant peu recherché par les abeilles) qui assurent la couverture des besoins énergétiques des pollinisateurs.

Une telle étude implique le couplage d'analyses du comportement de butinage des insectes et d'analyses chimiques des émissions de la plante.

MATERIELS ET METHODES

Etudes comportementales:

L'expérimentation a été menée sous tunnels, selon les conditions décrites par Pham-Delegue *et al.*, 1985. La pollinisation des lignées parentales de chacune des variétés hybrides est assurée sous des tunnels indépendants.

En 1982, les observations ont été effectuées sur des lignées parentales semées selon un motif 2/6, les deux rangs mâle-fertiles étant centraux et contigus. En 1983, afin d'apprécier l'existence éventuelle d'un "effet rang" sur le comportement de butinage des insectes, les parents de MARIANNE et MIRASOL ont été cultivés selon un motif de damier. Dans chaque tunnel, 40 plants mâle-fertiles et 40 plants mâle-stériles, à un stade de maturation similaire, ont été choisis pour les observations.

Une colonie d'abeilles domestiques (*Apis mellifica* L.), composée de 10.000 à 15.000 ouvrières, maintenues autour d'une reine et de son couvain, est introduite en début de floraison dans chaque tunnel.

La répartition des populations de butineuses sur les différentes lignées parentales est estimée en relevant à heure fixe (12 h. GMT) le nombre de butineuses par capitules, et le stade de maturation des capitules sur l'échantillon de 40 plantes par lignées. Les relevés sont effectués un jour sur deux en alternance pour chaque variété de tournesol, au cours de la floraison

Analyse des nectars :

Les nectars sont prélevés à l'aide de micropipettes de verre (contenance 5 µl), sur 10 capitules par lignées. Pour chaque capitule, le prélèvement est effectué sur les fleurons les plus centraux, jusqu'à concurrence de 20 fleurons en 1982 et 50 fleurons en 1983.

En 1982 les prélèvements ont été effectués quotidiennement à heure fixe (15 h. GMT) tout au long de la floraison et en 1983 un seul prélèvement par lignée a eu lieu au stade phénologique correspondant au maximum de sécrétion nectarifère défini par les données de l'année précédente (2/3 du capitule fleuri - cf. RESULTATS). Les conditions d'évaporation ont été homogénéisées par un ensachage des capitules avant les prélèvements.

L'estimation quantitative des volumes collectés est faite par lecture directe des micropipettes graduées en µl. Les échantillons sont ensuite stockés à -25°C en vue des analyses qualitatives :

les analyses qualitatives présentées ici portent sur la concentration totale en sucres et les concentrations relatives en différents sucres. La technique adoptée est la chromatographie en phase gazeuse après dérivatisation des sucres, qui a été décrite par ailleurs (Fonta *et al.*, 1985) ; elle permet notamment d'analyser avec précision de faibles quantités de nectar (de l'ordre de 1 µl).

Analyse des arômes :

Les émissions volatiles de la plante sont recueillies sur matériel végétal vivant par la méthode du "head-space", décrite par Azar (1982) et Pham-Delegue *et al.* 1984; les extraits ont été obtenus en 1982, pour chaque lignée, à partir de 3 capitules à des stades de floraison différents (floraison de 1/3, 2/3 et de la totalité des fleurons tubulés).

Les extraits collectés ont ensuite été analysés par chromatographie en phase gazeuse (selon les conditions décrites par Etievant *et al.*, 1984). Les profils chromatographiques obtenus (à raison de 2 injections par échantillon) ont fait l'objet d'une comparaison statistique :

l'effet "lignée" a été recherché par une analyse de variance non orthogonale, sur modèle croisé, variable par variable (chaque variable correspondant à la surface intégrée d'un pic rapportée à la surface totale du chromatogramme). En outre, l'effet du facteur "stade" a été estimé par comparaison 2 à 2 des moyennes obtenues pour chaque variable aux différents stades

RESULTATS et DISCUSSION.

- La distribution des insectes sur les couples de lignées parentales reportée dans la Figure 1, fait apparaître un comportement sélectif des abeilles entre les parents de MARIANNE, tandis qu'elles se répartissent aléatoirement sur les parents de MIRASOL. La reproductibilité d'un tel comportement, quelque soit le motif de semis adopté (en rangs 2/6 ou en damier) met bien en évidence la préférence des butineuses pour la lignée maternelle de MARIANNE et leur aptitude à discriminer les génotypes végétaux.

Les visites d'insectes enregistrées au cours de la floraison sur deux années successives, fait apparaître une préférence pour les stades I et II (respectivement 1/3 et 2/3 des fleurons tubulés fleuris), avec le plus souvent un maximum de visites au stade II (Figure 2).

- Les fortes fréquentations de la culture au stade II correspondent au maximum de sécrétions nectarifères ainsi que l'indiquent les relevés de l'année 1982 (Tableau 1) ; ce résultat va dans le sens de ceux établis par les auteurs qui ont cherché à corréliser les visites d'insectes et les quantités de nectar secrétées par le tournesol (Cirnu *et al.*, 1974, 1976 ; Tepedino *et al.*, 1982). Toutefois, contrairement à ces auteurs, nous n'avons pas pu établir de corrélations strictes entre la distribution des abeilles entre différents génotypes et les productions et concentrations en sucres de nectars correspondants (Fonta *et al.*, 1984 ; Fonta *et al.*, 1985). En outre ces paramètres s'avèrent relativement peu reproductibles d'une année à l'autre (Tableaux 1 et 2).

Par contre la composition glucidique des nectars se montre très stable pour les 2 années expérimentales, un "pattern glucidique" donné correspondant à chaque génotype végétal : glucose, fructose et saccharose ont ainsi été identifiés, présents dans des proportions caractéristiques du génotype considéré (Figure 3).

De plus, il apparaît que le saccharose joue un rôle déterminant dans le choix des butineuses : ainsi la préférence des abeilles pour la lignée maternelle de MARIANNE correspond à de fortes teneurs en saccharose des nectars, par opposition à la lignée fertile riche en glucose et fructose mais pratiquement dépourvue de saccharose ; en l'absence de saccharose, comme c'est le cas des lignées parentales de MIRASOL les abeilles n'établissent pas de discrimination significative.

- Concernant les arômes, nous avons cherché à quantifier les éventuelles différences entre les émissions volatiles des capitules en fonction des génotypes et du stade phénologique du végétal, susceptibles d'intervenir dans l'orientation sélective à distance des butineuses. Une revue exhaustive des composés volatiles identifiés dans l'arôme de tournesol a été présentée par Etievant *et al.* (1984) et l'étude détaillée des variations génétiques et phénologiques des productions aromatiques est présentée par ailleurs (Pham-Delegue *et al.*, en préparation) ; nous ne présenterons ici que certains résultats préliminaires. A partir des chromatogrammes obtenus, 144 variables ont été répertoriées pour les parents de MARIANNE et 136 pour ceux de MIRASOL. Parmi ces variables, des différences signi-

ficatives sont apparues, entre les lignées d'une part ("effet lignée") et les stades d'autre part ("effet stade") (Tableau 3). On notera que les variables qui différencient les lignées parentales concernent moins de 40 % du chromatogramme global pour les parents de MARIANNE et moins de 30 % pour les parents de MIRASOL.

Les variations observées entre les parents des 2 variétés sont d'ordre qualitatif (présence d'une variable dans le profil chromatographique d'une seule des 2 lignées parentales) ou quantitatif (présence d'une même variable en proportions significativement différentes dans les 2 lignées) ; toutefois les variations d'ordre quantitatif sont proportionnellement plus fréquentes (environ 90 % des variations) que celles d'ordre qualitatif.

Les variations liées à l'effet stade, plus nombreuses pour les parents de MIRASOL, correspondent dans environ 60 % des cas à un maximum d'émission du composé volatil au stade III (totalité des fleurons tubulés fleuris) ; l'augmentation de ces productions volatiles correspondrait à une augmentation du nombre des fleurons sur le capitule.

Finalement, il apparaît que les choix effectués par les abeilles parmi les lignées proposées sont déterminés principalement par la nature des glucides du nectar, le saccharose présentant un caractère attractif marqué ; le repérage à distance des sources de nectar fait intervenir les aptitudes des butineuses à utiliser les émissions volatiles de la plante comme signaux de reconnaissance et à discriminer parmi ces mélanges aromatiques complexes, sur la base de différences qualitatives et quantitatives limitées à une fraction de l'arôme global, les "patterns aromatiques" correspondant à la source alimentaire la plus satisfaisante.

L'ensemble de ces critères d'orientation et le choix alimentaire des insectes pollinisateurs sont à prendre en compte dans l'optique d'une pollinisation contrôlée et d'une sélection variétale raisonnée.

REMERCIEMENTS :

L'ensemble des travaux présentés a fait l'objet d'une collaboration avec la Station d'Amélioration des Plantes INRA de Clermont-Ferrand et a bénéficié du soutien technique et matériel des organismes PROMOSOL, UCST et ITAPI. Nous tenons également à remercier E. Guichard*** et E. Leblond* pour leur collaboration au traitement statistique des profils chromatographiques d'arômes.

BIBLIOGRAPHIE

- AZAR M., 1982. - Pollinisation du tournesol par les insectes sociaux. Etude des allomones émises par les fleurs. Mémoire de DEA, Chimie, Université de Dijon, 34 p.
- CIRNU I., DUMITRACHE V., HOCIOTA E., AVRAMESCU P., 1976. - Variabilité de la production de nectar et du degré d'attraction des variétés et des hybrides de tournesol (*Helianthus annuus* L.) pour les abeilles. Rev. fr. Apic., 344, (juillet 1976), 332-333.
- ETIEVANT P.X., AZAR M., PHAM-DELEGUE M.H., MASSON C.J., 1984. - Isolation and identification of volatile constituents of Sunflowers (*Helianthus annuus* L.) J. Agric. Food Chem., 32 (3), 503-509.

- FONTA C., PHAM-DELEGUE M.H., MARILLEAU R., DOUAULT Ph., MASSON C., POUVREAU A., 1984. - Relations entre le comportement de butinage d'*Apis mellifica* et de *Bombus terrestris* L. et la composition glucidique des nectars de tournesol, Vème Symp. Int. sur la Pollinisation, Versailles, Les Colloques de l'INRA n° 21, 39-50
- FONTA C., PHAM-DELEGUE M.H., MARILLEAU R., MASSON C., 1985. - Rôle des nectars de tournesol dans le comportement des insectes pollinisateurs et analyse quantitative et qualitative des éléments glucidiques de ces sécrétions, Acta Oecologica Appl., sous presse.
- LECLERCQ P., 1969. - Une stérilité mâle cytoplasmique chez le tournesol. Ann. Amélior. Plantes, 19 (2), 99-106.
- PARKER F.D., 1981. - Sunflower pollination : abundance, diversity and seasonality of bees on male-sterile and male-fertile cultivars. Environ. Entomol., 10, 1012-1017.
- PHAM-DELEGUE M.H., FONTA C., MASSON C., ETIEVANT P., DOUAULT Ph., MARILLEAU R., CHAUFAILLE J., 1984. - Signaux chimiques et pollinisation par les insectes : une approche pluridisciplinaire, Vème Symp. Int. sur la Pollinisation, Versailles, les Colloques de l'INRA, n° 21, 97-103.
- PHAM-DELEGUE M.H., FONTA C., MASSON C., DOUAULT Ph., 1985. - Etude comparée du comportement de butinage des insectes pollinisateurs (abeilles domestiques *Apis mellifica* L. et bourdons *Bombus terrestris* L.) sur les lignées parentales d'hybrides de tournesol *Helianthus annuus* L., Acta Oecologica, Oecol. Applic., sous presse.
- TEPEDINO V.J., PARKER F.D., 1982. - Interspecific differences in the relative importance of pollen and nectar to bee species foraging on sunflowers. Environ. Entomol., 11, 246-250.

Tableau I : Quantités moyennes de nectar sécrété (en µl)
 Stade I : 1/3 des fleurons tubulés fleuris
 Stade II : 2/3 " " " "
 Stade III: totalité des fleurons tubulés fleuris.

| Variétés | MARIANNE | | | | | | MIRASOL | | | | | |
|----------|--------------|-----|-----|--------------|------|-----|--------------|-----|-----|--------------|-----|------|
| | Mâle stérile | | | Mâle fertile | | | Mâle stérile | | | Mâle fertile | | |
| Stades | I | II | III | I | II | III | I | II | III | I | II | III |
| 1982 | 0,9 | 2,2 | 1,2 | 1 | 2 | 1,3 | 2,9 | 3,9 | 1,5 | 2,8 | 2 | 1,35 |
| 1983 | | 1,6 | | | 6,35 | | | 4 | | | 9,8 | |

Tableau 2 : Proportions en sucres totaux (en % du nectar récolté) au stade II de floraison.

| Variétés | MARIANNE | | MIRASOL | |
|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Mâle stérile | Mâle fertile | Mâle stérile | Mâle fertile |
| 1982 | 48,3 | 47,2 | 26,6 | 28,7 |
| 1983 | 37 | 43,6 | 30 | 43,3 |

Tableau 3 : Pourcentages de variables significativement différentes en fonction de la lignée et du stade du végétal, après comparaison statistique des profils chromatographiques (les valeurs entre parenthèses correspondent au nombre de variables).

| Variétés | MARIANNE | MIRASOL |
|--------------------------|----------|---------|
| Variables répertoriées | (144) | (136) |
| Effets "lignée" | 38 (55) | 29 (39) |
| variations qualitatives | 11 | 8 |
| variations quantitatives | 89 | 92 |
| Effet "stade" | 36 | 40 |

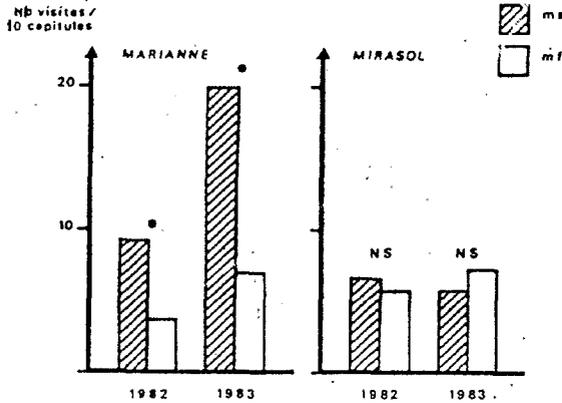


Figure 1 : Distribution des visites d'abeilles sur les couples de lignées parentales (ms : lignée mâle-stérile ; mf : lignée mâle-fertile - Test t de Student sur la moyenne des observations effectuées au cours de la floraison).

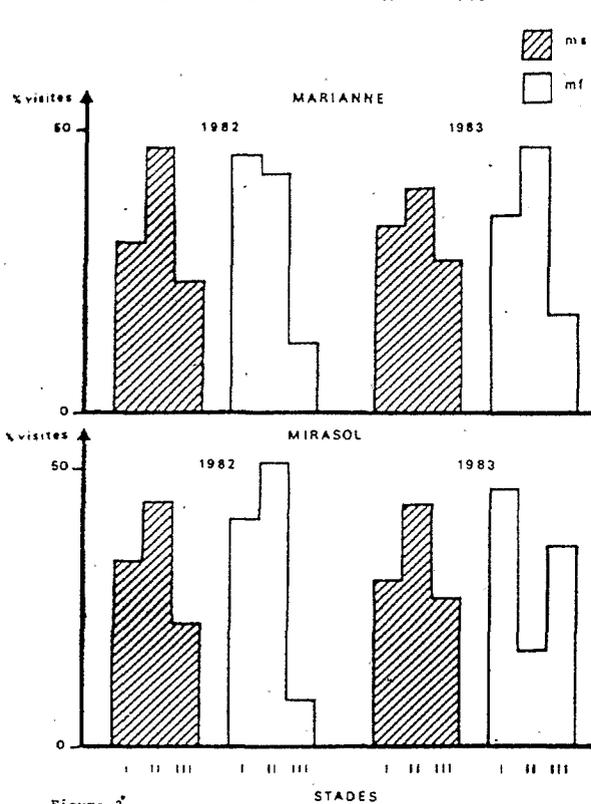


Figure 2 :

Répartition des visites d'abeilles sur les couples de lignées parentales en fonction du stade de floraison des capitules
 Stade I : 1/3 des fleurons tubulés fleuris
 Stade II : 2/3 des fleurons tubulés fleuris
 Stade III : totalité des fleurons tubulés fleuris
 (ms : lignée mâle-stérile ; mf : lignée mâle-fertile)

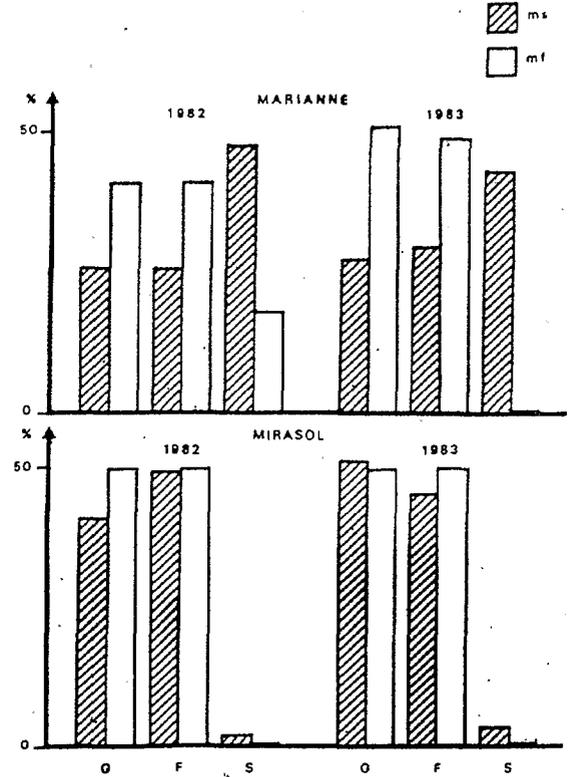


Figure 3 :

Proportions des glucides du nectar (G : glucose ; F : fructose ; S : saccharose) en fonction des lignées considérées (ms : lignée mâle-stérile ; mf : lignée mâle-fertile).