

Insectes butineurs et transport de pollen : 1^{er} maillon de l'étude du service de pollinisation rendu par l'écosystème prairial

FARRUGGIA A. (1), DELACROIX E. (2), MICHELOT-ANTALIK A (2)., MICHEL N. (2), LANORE L. (1), GENOUD D. (4), BERARD A. (3), CHAUVEAU A. (3), NOVAK S. (5), FIORELLI J-L. (6), BLANCHETETE A. (7), ODOUX J-F. (8), GALLIOT J-N. (3), BRUNEL D. (3)

(1) UMR1213 Herbivores, INRA, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

(2) UMR 1121 Agronomie & Environnement Nancy-Colmar, Université de Lorraine, INRA, F-54518 Vandoeuvre-lès-Nancy,

(3) US1279 EPGV, CEA/IG/CNG, 91057 Evry, France

(4) DGE, 2 domaine Bellevue, 11290 Arzens, France

(5) UE1373 Ferlus, INRA, F-86600 Lusignan, France

(6) UR0055 Aster, INRA, 88500 Mirecourt, France

(7) UE1414 Herbipole, INRA, Site de Marcenat, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

(8) UE1255 Entomologie, INRA, Magneraud, 17700 Surgères, France

RESUME

Le service de pollinisation rendu par l'écosystème prairial est très souvent mis en avant mais il est peu explicité et peu quantifié. L'objectif de cette étude est de quantifier les interactions plante-insecte à l'origine de ce service dans des prairies appartenant à 3 agrosystèmes contrastés. Pour cela, nous avons capturé les insectes butinant les fleurs sur des transects, à 3 périodes de l'année, dans 18 prairies présentant un gradient de richesse floristique et appartenant aux 3 fermes expérimentales INRA situées à Marcenat (Cantal), Mirecourt (Vosges) et Lusignan (Vienne). Nous avons testé en parallèle une méthode d'analyse basée sur le méta-barcoding, permettant la détermination simultanée de l'insecte et des pollens qu'il transporte. Nous avons analysé 979 couples fleur-insecte butineur. Les résultats mettent en évidence le rôle important des Diptères dans les prairies permanentes tempérées multi-espèces en tant que butineurs et pollinisateurs potentiels, notamment en début de saison de végétation. Elle montre également que les interactions entre familles d'insectes et familles de plantes observées à Marcenat sont plus nombreuses et réparties plus équitablement qu'à Mirecourt et Lusignan. Une forte proportion des insectes capturés (82 %) transportait du pollen et l'analyse des barcodes ADN révèle que 44 % transportaient en même temps de 2 à 6 genres botaniques différents. Ces premiers résultats permettent d'identifier les acteurs potentiels du service de pollinisation dans les prairies.

Flower-foraging insects and their pollen loads: first step to study the pollinating service provided by grasslands

FARRUGGIA A. (1), DELACROIX E. (2), MICHELOT-ANTALIK A (2)., MICHEL N. (2), LANORE L. (1), GENOUD D. (4), BERARD A. (3), CHAUVEAU A. (3), NOVAK S. (5), FIORELLI J-L. (6), BLANCHETETE A. (7), ODOUX J-F. (8), GALLIOT J-N. (3), BRUNEL D. (3)

(1) UMR1213 Herbivores, INRA, Saint-Genès Champanelle, France

SUMMARY

The pollination service provided by the grasslands is very often highlighted, but it is poorly clarified and poorly quantified. The objective of this study was to quantify plant-insect interactions at the origin of this service in grasslands belonging to three contrasted agrosystems. To do this, we captured insects foraging flowers over 3 periods on transects in 18 grasslands within a gradient of floristic diversity and owned on three experimental farms of Inra located at Marcenat (Cantal), Mirecourt (Vosges) and Lusignan (Vienna). We tested in parallel an analysis method based on barcoding, allowing the simultaneous determination of the insect and pollen it carries. We analyzed 979 flower-foraging insect couples. The results highlight the important role of Diptera in the temperate grassland multi-species as foragers and potential pollinators, particularly at the beginning of the growing season. It also shows that interactions between insect families and plant families observed in Marcenat were more numerous and distributed more equitably than in Mirecourt and Lusignan. Moreover, analysis of pollen using DNA barcodes pointed out that a large proportion of the captured insects (82%) carried pollen and that 44% carried two to six different botanical genera. These first results allow identifying some actors of the pollination service in grasslands.

INTRODUCTION

Le service de pollinisation assuré dans les agrosystèmes est primordial d'un point de vue socio-économique car il permet de maintenir la diversité des communautés végétales et il influe sur la production d'un tiers des cultures alimentaires mondiales. Actuellement, ce service a été surtout étudié et décrit dans les régions de grandes cultures, pour lesquelles les enjeux économiques sont majeurs. Dans ces régions, les prairies existantes sont considérées comme des milieux

semi-naturels qui jouent un rôle précieux d'habitat refuge et d'habitat pourvoyeurs de ressources alimentaires des cortèges d'insectes pollinisateurs. Dans les systèmes herbagers ou dans les systèmes de polyculture-élevage dans lesquels l'élevage tient une place importante, les interactions insectes-plantes prairiales sont moins bien connues. Dans ces contextes, la pollinisation par les insectes contribue à assurer la reproduction de la plupart des dicotylédones prairiales et a donc un rôle essentiel à jouer sur la diversité floristique et la pérennité des prairies. Par ailleurs, la plupart des études sur le service de pollinisation se focalisent sur les

abeilles alors que des travaux très récents ou au contraire plus anciens montrent qu'il existe une diversité d'insectes qui participent au transport de pollen. L'étude présentée ici, a pour objectifs d'identifier les espèces impliquées dans les interactions plantes-butineurs dans trois contextes agricoles contrastés. Ainsi notre étude a pour ambition de répondre aux deux questions suivantes : (1) Quels sont les insectes butineurs des prairies et quelles sont les fleurs qu'ils visitent selon les contextes agricoles, la diversité botanique des prairies et la période ? (2) Ces insectes transportent-ils du pollen et si oui, de quelle (s) plante (s) ?

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. LES SITES D'ETUDE

L'étude a été conduite au sein de trois expérimentations système en production laitière mises en place dans les fermes expérimentales de l'INRA : à Lusignan (Vienne) à 150 m d'altitude sur le plateau des Terres Rouges du Poitou, à Mirecourt (Vosges) à 300 m d'altitude dans la plaine des Vosges et à Marcenat (Cantal) à 1000-1300 m d'altitude sur le plateau herbager volcanique du Cézallier. Les fermes sont situées dans des contextes agricoles contrastés. Dans la Vienne, la STH (Surface toujours en herbe) est quasi relictuelle avec 4 % du territoire tandis que les terres labourées occupent presque les 2/3 du territoire départemental et les surfaces boisées 1/5. Dans les Vosges, la STH est encore présente sur 23 % du territoire et la surface boisée occupe la moitié du département. Enfin, dans le Cantal, près de la moitié du territoire est couvert par la STH et la surface boisée représente presque un tiers du département (INSEE, 2014). Les sites se positionnent également sur un gradient de températures moyennes annuelles avec respectivement 11,7 °C à Lusignan, 9 °C à Mirecourt et 7,5 °C à Marcenat.

Dans chacune de ces expérimentations système, six prairies ont été choisies le long du gradient de diversité floristique des prairies propre à chaque site (Lusignan : 8 à 14 espèces ; Mirecourt : 20 à 34 ; Marcenat : 17 à 86). A Mirecourt et à Marcenat, les prairies sont toutes permanentes alors qu'à Lusignan, 4 prairies sont temporaires et deux prairies sont permanentes.

1.2. LES OBSERVATIONS ET LES PRELEVEMENTS

Dans chacune des 18 prairies, les insectes butinant activement les fleurs ont été capturés sur des transects de 100 m de long par 4 m de large, directement à l'aide d'un flacon stérile. Seuls les insectes très vifs ou craintifs ont été capturés avec un filet et transférés ensuite dans un flacon. Le temps passé sur chaque transect était de 15 min (hors temps de capture et de conditionnement). L'échantillonnage a eu lieu en 2015 à Marcenat et en 2016 à Mirecourt et Lusignan. Trois campagnes d'échantillonnage de 3 jours de piégeage par parcelle ont été réalisées sur les 3 sites : avril-mai pour la campagne 1, juin pour la campagne 2 et juillet pour la campagne 3. Trois jours de capture consécutifs (dans la mesure du possible en fonction de la météo), ont été effectués par prairie et par campagne. Les captures ont été réalisées entre 10 h et 19 h, sous des conditions climatiques clémentes. Dans une campagne et au cours des trois jours, chaque parcelle était visitée une fois le matin, une fois en début d'après-midi et une fois en fin d'après-midi de façon à ce que chaque parcelle soit échantillonnée sur l'ensemble de la journée durant les trois jours. Ces trois jours ne sont pas considérés comme des répétitions mais comme un moyen d'échantillonner le plus exhaustivement possible la gamme des couples insecte-fleur en faisant l'hypothèse que certains insectes prospectent les fleurs à certaines périodes de la journée. Au total, 162 transects ont été effectués sur les 18 prairies (3 sites x 6 parcelles x 3 campagnes x 3 jours). Parallèlement à ces captures, la fleur sur laquelle l'insecte était en train de butiner était identifiée à l'espèce ou le cas

échéant au genre. Dans la zone de 400 m² prospectée, le recouvrement par les trois couleurs de fleurs (blanche, jaune ou mauve-bleu-rose) était estimé à chaque passage sur chaque transect et le recouvrement total était calculé. Enfin, toutes les plantes en fleurs étaient identifiées.

1.3. LES ANALYSES DES ECHANTILLONS PAR META-BARCODING ADN

Le méta-barcoding ADN a été utilisé car cette méthode permet potentiellement la détermination de l'espèce d'insecte et du cortège de pollens transporté par celui-ci. Pour cela, chaque flacon contenant un insecte capturé a été rempli de 40 ml d'alcool à 60 %, puis agité pendant 10 secondes pour enlever le pollen du corps de l'insecte. Une fois le flacon agité, l'insecte était retiré de la solution et ses deux pattes antérieures ont été prélevées et placées dans 1,5 ml d'alcool à 60 % dans un micro-tube. Le pollen en solution a ensuite été filtré, récupéré sur une membrane en nylon puis placé dans le microtube avec les 2 pattes et 30 µl d'une solution tampon d'extraction d'ADN (Menchari et al 2006). L'ensemble a été broyé pendant 30 secondes à l'aide d'un embout adapté à la forme du tube. Un microlitre de l'échantillon a été amplifié à l'aide d'un couple d'amorces correspondant à la région du rDNA cistron pour les pollens (amorces ITS-5a et ITS-4 ; Chen et al., 2010) et d'un autre couple correspondant au gène codant la sous-unité 1 de Cytochrome oxydase (COI) pour les insectes (MicroLepF3_t1 et Type R1, Hebert et al., 2013). Lors des PCR, un tag permettant d'identifier chaque échantillon a été ajouté. Après séquençage sur un appareil Illumina Miseq (2x300 cycles), les reads ont été assignés aux genres ou aux espèces par l'outil de mapping (CLC Genomics Workbench version 8.0.2) sur une base de donnée téléchargée (base de données ITS2 Keller et al., 2014) et deux construites par nos soins à partir du NCBI (rDNA cistron pour les plantes et COI pour les insectes). Les critères de mapping choisis ont été les suivants : longueur (L) = 98% et similarité (S) = 98% pour les plantes et L=100 et S=95% pour les insectes. Parallèlement, l'insecte a été épinglé pour la détermination morphologique et identifié jusqu'à l'espèce quand c'était possible, sinon au genre, à la famille voire à l'ordre. La méthode du méta-barcoding a été utilisée pour l'instant uniquement sur des échantillons prélevés à Marcenat en 2015 sur la campagne 0 réalisée au tout début mai et sur la campagne 1, soit sur 233 insectes.

2. RESULTATS

2.1. QUEL INSECTE BUTINE QUELLE FLEUR ?

Sur les 3 campagnes et les 3 sites, nous avons observé et capturé près de 1000 insectes butineurs soit une moyenne de 6 individus par transect de 15 min. L'identification visuelle a permis de déterminer 583 individus à l'espèce (60 %) et 844 au genre. Au total, 107 espèces différentes d'insectes pour 50 familles d'insectes différentes ont été identifiées. Seulement 5 espèces de butineurs (4 espèces d'abeille et 1 espèce de Diptère) et 10 genres sont communs aux 3 sites. Onze espèces d'insectes ont pu être observées sur l'ensemble de la saison, c'est à dire parmi chacune des trois campagnes de prospection. Le nombre d'individus capturés et la richesse en espèces d'insectes identifiés sont similaires entre Mirecourt (386 insectes et 56 espèces dont 28 espèces d'abeilles sauvages) et Marcenat (351 insectes et 50 espèces dont 20 espèces d'abeilles sauvages). Dans ces 2 sites, les Diptères ont représenté plus de la moitié des captures (respectivement 54 % et 65 %) suivis par les Hyménoptères (28 % et 24 %) (Figure 1). Parmi les Diptères, les familles des Syrphidés et des Empididés sont sensiblement plus abondantes à Mirecourt (18 % et 28 %) qu'à Marcenat (13 % et 20 %). Les proportions d'abeilles domestiques, de bourdons et d'abeilles sauvages (hors bourdons) sont faibles et très proches (respectivement 5 ; 5 ; 10 vs. 6 ; 4 ; 15 %) entre ces 2 sites. Parmi les abeilles sauvages, ce sont les espèces de la famille des Halictidés qui sont les plus

représentés (55 % des abeilles sauvages des deux sites). Les Coléoptères et les Lépidoptères représentent une très faible proportion des individus capturés (respectivement 8, 9 vs. 7, 4 %). Enfin, quelques individus d'Orthoptères et d'Hémiptères ont été capturés alors qu'ils consommaient le nectar. A Lusignan, le nombre d'insectes butineurs et la richesse spécifique sont nettement plus réduits avec 242 individus capturés pour 33 espèces (17 espèces d'abeilles sauvages). Sur ce site, les Diptères sont très peu présents (10 %) et les Hyménoptères sont les principaux butineurs (79%) avec notamment une large dominance des bourdons (43 % des Hyménoptères) et des abeilles domestiques (24 %) (Figure 1). Du point de vue de l'évolution des butineurs en fonction de la campagne de collecte, tous sites cumulés, le nombre de Diptères et en particulier des Empididés diminue fortement de la campagne 1 à la campagne 3, à l'exception des Syrphidés qui au contraire occupent une part de plus en plus importante dans les captures, passant de 6 % à 19 % entre la première et la troisième campagne. En revanche, le nombre d'Hyménoptères est multiplié par 3 entre la première et la troisième campagne, avec une forte progression des bourdons et des abeilles domestiques tandis que le nombre d'abeilles sauvages reste constant.

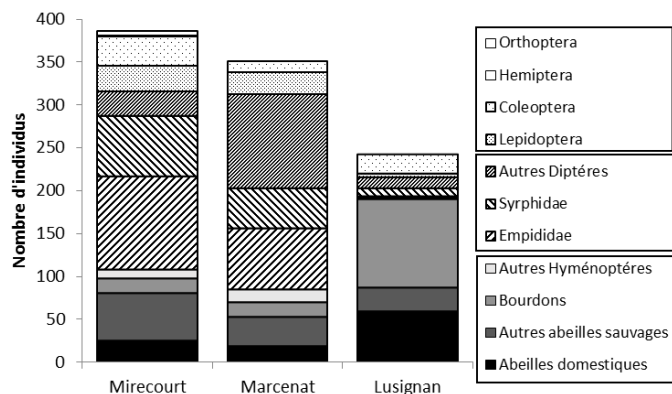


Figure 1 : Nombre d'individus butinant par groupe taxonomique d'insecte et par site (Blocs Hyménoptères, Diptères, autres ordres)

Au total, nous avons identifié 20 familles différentes de fleurs prairiales butinées. Les Astéracées sont la famille la plus largement butinée (38 % des interactions), notamment grâce au genre *Taraxacum* et au genre *Centaurea*, suivies par les Renonculacées (20 %), les Fabacées (16 %) avec dans la grande majorité des interactions avec *Trifolium repens* (14 %), les Dipsacacées (9 %) grâce au genre *Knautia* et les Apiacées (6 %). Une capture correspondant à une observation d'une interaction plante-insecte, nous avons de fait observé 979 couples de butineur-fleur dont 234 couples différents. Parmi les 295 interactions identifiées jusqu'à la famille à Marcenat, 78 interactions famille d'insecte-famille de plantes distinctes ont pu être observées, les plus fréquentes étant entre la famille des Syrphidés et celle des Renonculacées, suivi des Empididés sur Astéracées ou Apiacées et des Apidés sur Fabacées (Figure 2a). A Mirecourt, 61 interactions famille-famille distinctes sur 363 ont été observées : la majorité entre la famille des Empididés sur Renonculacées, des Syrphidés sur Astéracées et des Halictidés sur Astéracées (Figure 2b). Enfin, à Lusignan, seulement 29 interactions famille-famille distinctes sur 239 ont été observées, la moitié de celles-ci ayant lieu entre la famille des Apidés et celle des Fabacées (Figure 2c). Un gradient est observé concernant la nature et l'abondance des interactions des trois sites. Les interactions entre familles d'insectes et familles de plantes observées à Marcenat sont plus nombreuses et réparties plus équitablement qu'à Mirecourt et qu'à Lusignan (Indice de Shannon, $H = 3.855$; 3.108 et 2.126 respectivement).

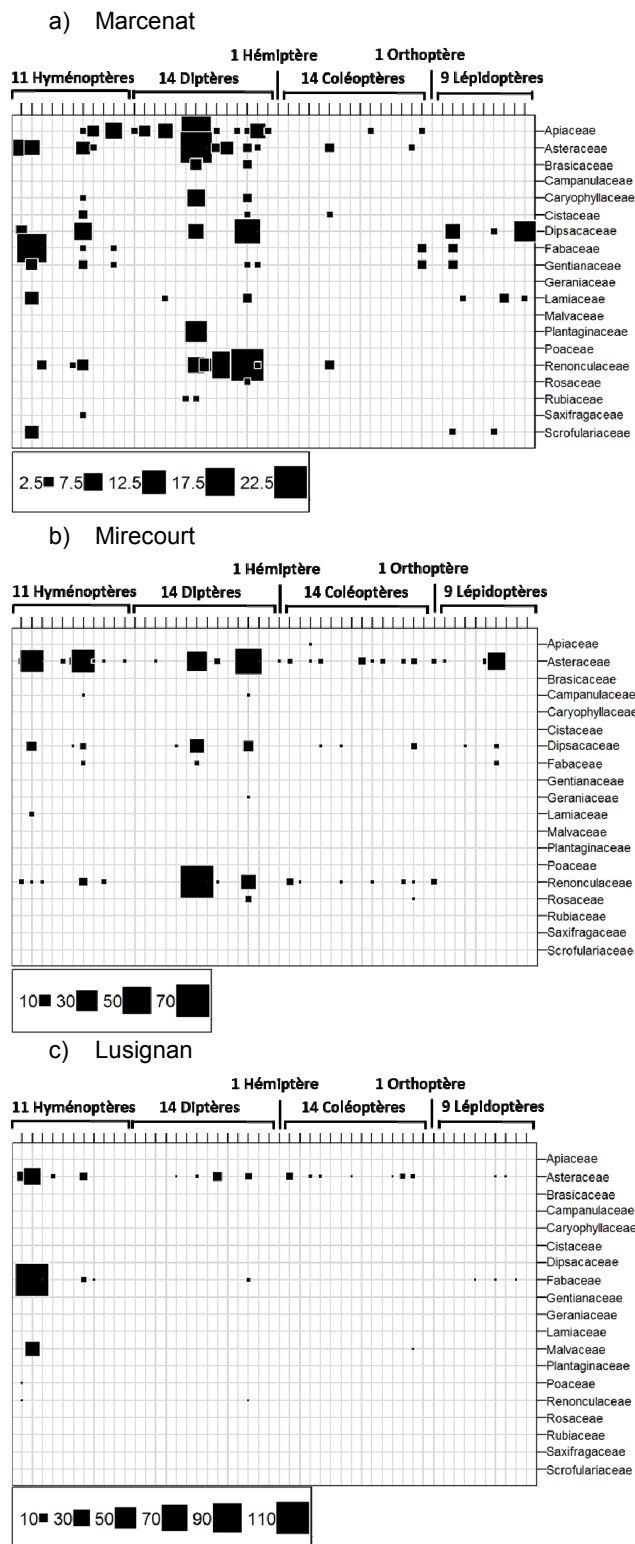


Figure 2 : Nombre et nature des interactions par site entre les insectes et les plantes selon les familles taxonomiques

2.2. QUELLES PARCELLES SONT LES PLUS BUTINEES ?

En considérant les trois campagnes sur les 18 prairies, nous avons mis en évidence que plus le nombre d'espèces de plantes en fleurs sur le transect est élevé et plus l'abondance et la richesse en insectes butineurs sont importantes (coefficient de spearman $r_s = 0,334$, $p < 0,05$; $r_s = 0,345$, $p < 0,05$, respectivement). De même, plus le recouvrement coloré est élevé et plus l'abondance et la richesse en butineurs sont importantes ($r_s = 0,532$, $p < 0,001$; $r_s = 0,539$, $p < 0,001$, respectivement).

2.3. QUEL INSECTE TRANSPORTE QUEL POLLEN ?

Les analyses par méta-barcoding ont permis d'obtenir un ensemble d'informations sur les transports de pollen et sur les insectes butinant. Ainsi, du pollen a été détecté sur 82 % des insectes capturés à Marcenat lors des deux campagnes de début et fin mai. Sur les 233 individus analysés, 38 % transportent un seul genre botanique de pollen tandis que 44 % d'entre eux transportent de 2 à 6 genres botaniques différents de pollen. Les insectes sur lesquels aucun pollen n'a été détecté sont pour la plupart des mouches de petites tailles et des papillons. Ce sont les genres *Tenthredo spp.* (Hyménoptères) et des *Empis spp.* (Diptères) qui portent 5 genres botaniques ou plus de pollen sur leur corps. 3% des insectes transportent des pollens ne provenant pas de plantes prairiales comme *Betula sp.* ou *Quercus sp.* Du point de vue de l'identification des insectes, seulement 27 % des insectes, appartenant à 23 espèces différentes, ont été identifiés. La plupart sont des Diptères (84%). 24 % n'ont pas pu être identifiés alors que l'extraction et l'amplification PCR ont bien fonctionné. Enfin pour près de la moitié des individus la PCR n'a pas fonctionné correctement, la plupart d'entre eux étant des Hyménoptères ou des très petites mouches.

3. DISCUSSION

Malgré le peu d'espèces communes aux trois sites, les proportions des différents ordres de butineurs permettent de rapprocher les sites de Marcenat et de Mirecourt. Ces sites sont caractérisés par une forte abondance de Diptères et des abondances proches d'Hyménoptères. Cette ressemblance peut s'expliquer par la plus grande diversité floristique des prairies échantillonnées et par un territoire à proximité des parcelles qui est davantage occupé par des prairies permanentes que ne l'est le site de Lusignan. Elle peut être due également à leur climat relativement similaire et notamment aux basses températures du début de printemps. Cette prévalence des Diptères confortent les travaux d'Orford et al. (2015) qui estiment que deux tiers des insectes pollinisateurs en milieu agricole appartiennent à cet ordre. Parmi les Diptères, la famille des Empididées s'est révélée abondante dans les deux sites, ce qui correspond aux observations de Lefebvre et al. (2014) dans les prairies alpines. Ces résultats permettent également d'alerter sur le très petit nombre de taxonomistes qui sont capables d'identifier les espèces de cet ordre au-delà des Syrphidés. A Lusignan, les butineurs sont en revanche principalement des Hyménoptères et notamment des bourdons et des abeilles domestiques qui butinent le trèfle blanc. La présence importante du trèfle dans les prairies temporaires de ce site constitue un attrait pour ces insectes sociaux en particulier parce que l'abondance de ce dernier permet une récolte massive et rapide de pollen et/ou de nectar, nécessaire à leurs colonies.

Globalement sur les 3 sites, nos résultats confirment que plus la ressource trophique, exprimée au travers de la richesse en plantes en fleurs et du recouvrement coloré au moment du transect, est élevée et plus l'abondance et la richesse des butineurs sont élevées. Nous n'avons pas rencontré d'interactions exclusives (une plante en interaction avec un insecte unique ou inversement). La plupart des plantes sont en interaction avec une large gamme d'insectes et les insectes exploitent pour la plupart des ressources de fleurs variées. Toutefois, il existe un gradient de diversité des couples plante-insecte de Marcenat à Lusignan en passant par Mirecourt, Marcenat étant un milieu strictement herbager préservé avec une richesse de plantes encore importante.

Concernant la dynamique temporelle des cortèges d'insectes sur les 3 sites, nous avons observé que les communautés de butineurs sont soumises à un « turnover » temporel important au cours de la saison et sans doute d'une année sur l'autre.

Or, l'échantillonnage a eu lieu en 2015 à Marcenat et en 2016 à Mirecourt et à Lusignan, ce qui pourrait influencer en partie les différences observées entre sites. Néanmoins, nous

avons mis en évidence une augmentation des bourdons et des abeilles domestiques au cours de la saison. Cela peut s'expliquer par les pics d'activité saisonniers de ces colonies ou par l'attractivité des ressources, du milieu du printemps jusqu'au début de l'automne. La décroissance des Empididés quant à elle, peut être reliée aux phénologies du pissenlit et des différentes espèces de renoncules qui n'ont pu être observées qu'en début de saison et qui sont les principales fleurs sur lesquelles ils ont pu être observés.

Grace au méta-barcoding, nous avons également mis en évidence que la majorité des insectes butineurs capturés dans les prairies transporte de façon certaine du pollen. Un peu moins de la moitié des insectes capturés transportent au moins deux et plus de genres de plantes via le pollen, ce qui atteste du comportement de butinage très généraliste de certains insectes. Il nous reste cependant des améliorations à apporter à notre méthode. En effet, le méta-barcoding a permis d'identifier seulement un quart des individus capturés, principalement des Diptères. Le choix que nous avons fait de travailler avec un petit fragment interne au COI est sans doute à remettre en cause, car les amorces ont moins bien fonctionné pour les Hyménoptères et les Lépidoptères, entraînant une mauvaise lecture de leurs barcodes et une impossibilité d'assignement à une espèce. Par ailleurs, notre étude a mis en évidence l'absence de référencement des insectes des prairies dans la base internationale de données COI car près d'un quart des individus capturés n'ont pas pu être identifiés alors que nous sommes certains que l'amplification PCR et que le séquençage ont fonctionné.

L'observation des insectes en train de butiner et l'analyse des transports d'un pollen par un insecte particulier ne préjugent cependant pas du succès de la pollinisation des plantes visitées et par conséquent ne quantifie pas *sensu stricto* le service de pollinisation. En outre, il se peut que les insectes ne transportent pas seulement du pollen de plante en plante, participant ainsi à l'allofécondation, mais ils pourraient aussi contribuer à l'autofécondation des plantes par leur action mécanique au sein de la fleur visitée.

CONCLUSION

Notre étude constitue un premier pas vers l'étude du service de pollinisation rendu par l'écosystème prairial. Elle a permis d'identifier des acteurs potentiels de ce service dans des agrosystèmes contrastés, notamment les Diptères jusqu'à lors peu mis en avant dans la littérature scientifique. Ces derniers apparaissent de plus en plus comme des agents de la pollinisation en plus de leurs autres rôles dans les écosystèmes. Elle a aussi montré que le méta-barcoding est un outil puissant pour étudier ce service qui devrait très bientôt être opérationnel pour autant que les bases de données soient alimentées.

Les auteurs remercient le Méta-programme INRA Ecoserv pour le financement de ce projet intitulé « Polipré » ainsi que Xavier Lair pour son aide dans la détermination des Syrphes.

Chen S., Yao H., Liu C., et al. 2010., PLoS ONE 5, e8613.

Hebert P.D.N., deWaard J.R., Zakharov E. V., et al., 2013. PLoS ONE 8, e68535.

Keller A., Danner N., Grimmer G., et al., 2015. Plant Biol., 17, 558-566

Lefebvre V., Fontaine C., Villemant C., Daugeron C., 2014. Biol Lett. 10, 20140742

Menchari Y. Camilleri C., Michel S., Dessaint F., Le Corre V., Delye C. 2006. New Phytologist 171,861-874

Orford K.A., Vaughan I.P., Memmott J., 2015. Proc R Soc. B 282, 2014-2934