

INRA

Institut National de la Recherche Agronomique



Ingrid BOUCAUD
Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse
Institut Universitaire et Technologique
Génie Biologique, option Agronomie

RAPPORT DE STAGE

Le nourrissage au pollen comme méthode d'amélioration de l'activité pollinisatrice des abeilles domestiques sous abris

Laboratoire de Pollinisation & Ecologie des Abeilles
Unité Mixte de Recherche 406 INRA/UAPV
ABEILLES & ENVIRONNEMENT
Centre INRA d'Avignon, domaine Saint Paul

Tuteur IUT : Elise Buisson
Maître de stage : Bernard Vaissière, Chargé de Recherche INRA

Avril – Août 2008

Ingrid BOUCAUD
Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse
Institut Universitaire de Technologie
Génie Biologique, option Agronomie

RAPPORT DE STAGE

Le nourrissage au pollen comme méthode d'amélioration de l'activité pollinisatrice des abeilles domestiques sous abris

Laboratoire de Pollinisation & Ecologie des Abeilles
Unité Mixte de Recherche 406 INRA/UAPV
ABEILLES & ENVIRONNEMENT
Centre INRA d'Avignon domaine Saint Paul

Tuteur IUT : Elise Buisson
Maître de stage : Bernard Vaissière, Chargé de Recherche INRA

Avril-Août 2008

Présentation du sujet

La pollinisation des cultures date d'un siècle au plus et c'est seulement depuis ces 20 dernières années que cette pratique est devenue une activité à part entière des apiculteurs en France. L'activité pollinisatrice, dont une mesure est la quantité de pollen conspécifique déposée sur les stigmates des fleurs, est un facteur déterminant pour obtenir des fruits et des graines de qualité. Pour l'agriculteur comme pour l'apiculteur, l'enjeu est donc d'optimiser la gestion des colonies afin que les butineuses aient une activité pollinisatrice la plus élevée possible (Vaissière 2002).

Dans le cas des cultures sous abri pollinisées par les abeilles domestiques ou les bourdons, la quantité de pollen est limitée alors qu'elle doit couvrir à la fois les besoins des colonies et ceux de la pollinisation. Dans ces structures, la répartition du pollen entre corbicules des insectes et stigmates des fleurs peut donc poser problème. L'étude sur laquelle a porté le sujet de mon stage visait à déterminer si un nourrissage au pollen pouvait améliorer l'activité pollinisatrice des colonies d'abeilles domestiques. En effet, il a été observé qu'individuellement les butineuses de pollen étaient capables d'adapter leur récolte aux besoins de la colonie, c'est-à-dire en fonction de la quantité de pollen stocké dans la ruche et de la présence ou non de couvain (Dreller et Tarpy 2000), et que le fait de nourrir une colonie avec du pollen augmentait sa collecte en nectar et diminuait celle de pollen (Free 1967, Moeller 1972). L'hypothèse à tester était qu'un nourrissage au pollen pourrait permettre de limiter sa récolte par les abeilles de façon à ce que le maximum de pollen reste disponible pour la pollinisation.

Je présenterai également une méthode d'analyse des pelotes de pollen qui m'a permis de quantifier l'importance de cette récolte détournée par les abeilles à leur profit et perdue pour la pollinisation. Ces résultats illustrent aussi l'intérêt de limiter la récolte en pollen pour améliorer la pollinisation.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Luc Belzunces, directeur de l'UMR 406 Abeilles et Environnement à l'INRA d'Avignon, pour m'avoir permis de réaliser ce stage au sein de son unité.

Je témoigne toute ma gratitude envers Bernard Vaissière qui m'a accueilli dans le laboratoire de Pollinisation et Ecologie des Abeilles et proposé ce sujet. Je lui suis reconnaissante de m'avoir guidée et assistée tout au long de ce travail en parfait maître de stage.

Merci également à Elise Buisson qui a été mon tuteur à l'IUT d'Avignon.

Mes remerciements vont aussi à toutes les personnes qui ont participé avec moi aux expérimentations : Emilie Jouve, Nicolas Morison et Patrice Lhuillier. Ainsi qu'à Colette Pelissier, documentaliste, qui a consacré une partie de son temps afin de m'aider dans mes recherches bibliographiques.

Enfin je tiens à remercier les apiculteurs Jean Aptel et Jean-Paul Vermandere ainsi que l'ensemble du laboratoire qui m'a accueilli et soutenu pendant mes quatre mois de stage : Chloé Dibos et Rémi Chifflet pour leur aide et leurs conseils, Marie-Josée Buffière, Corinne Chêne, Guy Rodet et tout le reste de l'équipe pour leur accueil et leur convivialité.

SOMMAIRE

	Pages
Introduction	1
I- Présentation de l'INRA	2
1) L'INRA	2
2) Le centre de recherche d'Avignon	2
3) Le pôle Abeilles et Environnement (UMR 406 INRA-UAPV)	3
4) Le Laboratoire de Pollinisation et Ecologie des Abeilles	4
II- Synthèse bibliographique	5
1) Les abeilles dans le règne animal	5
2) La pollinisation entomophile	5
3) Les abeilles, des pollinisateurs efficaces	6
4) Abeille domestique et agriculture	6
5) Le butinage chez l'abeille domestique	7
III- Matériels et méthodes	9
1) Tunnels expérimentaux	9
2) Support biologique de l'étude	10
a) Le modèle végétal	
b) Les colonies d'abeilles domestiques	
3) Variables relevées	11
a) Disponibilité en pollen et ressources alimentaires pour les abeilles	
b) Activité pollinisatrice et butinage	
c) Fructification	
d) Analyse des échantillons de stigmatite et des pelotes des abeilles	
4) Statistiques	15
IV- Résultats et analyse	16
1) Environnement de l'essai	16
a) Environnement climatique	
b) Masse florale et disponibilité en pollen	
c) Production de nectar	
2) L'activité pollinisatrice et l'efficacité pollinisatrice individuelle	17
a) Activité et comportement de butinage	
b) Activité pollinisatrice	
c) Efficacité pollinisatrice individuelle	
d) Contenu des pelotes en pollen	

	Pages
Conclusion	21
Conclusions personnelles	24
Bibliographie	25
Annexes	27

Introduction

Ces dernières années, on a observé un déclin des colonies d'abeilles. Les causes de ce phénomène, dénommé récemment 'syndrome d'effondrement des colonies', font débat. Mais il demeure que les apiculteurs subissent des pertes de colonies de plus en plus importantes, laissant ainsi de moins en moins de colonies disponibles pour la pollinisation des cultures. Par ailleurs, des inquiétudes existent aussi quant à l'impact qu'un trop grand nombre de colonies rassemblées sur un même lieu pourrait avoir sur la faune d'abeilles sauvages. Pour ces deux raisons, il est important de trouver des solutions afin de gérer les colonies d'abeilles domestiques utilisées par la pollinisation des cultures en vue de maximiser leur activité pollinisatrice.

Ces vingt dernières années, la production sous abri s'est considérablement développée, en particulier dans deux domaines : (i) pour les cultures maraîchères, elle permet d'obtenir des fruits hors-saison et de réduire les attaques de ravageurs et donc les traitements insecticides dans le cas des abris 'insectproof' ; (ii) pour les cultures porte-graines, il s'agit d'isoler les plantes pour éviter les contaminations par le pollen extérieur et de protéger les semences à maturité de la pluie. Mais l'isolation du milieu entraîne des problèmes de pollinisation importants. Sous abri, l'action du vent est quasiment nulle et ne permet pas le transport du pollen. De plus on y trouve très peu d'insectes pollinisateurs sauvages, en particulier sous les abris 'insectproof'. Dans ce genre de structures, l'utilisation d'insectes pollinisateurs peut donc se révéler indispensable.

Sous abri, la quantité de pollen est limitée et il est donc important de trouver des solutions afin d'améliorer l'activité pollinisatrice des abeilles. C'est dans cet objectif qu'un premier essai sur l'impact d'un nourrissage au pollen sur l'activité pollinisatrice des colonies d'abeille domestiques a été mené en 2000. Deux colonies ont été introduites à 3 jours d'intervalle chacune dans un tunnel contenant une culture de melon monoïque, et nourrie avec du pollen au bout de huit jours. Tout au long de l'essai, la disponibilité en pollen et en nectar ainsi que l'activité de butinage des colonies ont été relevées. J'ai pour ma part effectué toute l'analyse :

- des stigmates issus des fleurs en pollinisation libre (activité pollinisatrice) ;
- des stigmates issus des fleurs n'ayant reçu qu'une seule visite d'abeille (efficacité pollinisatrice individuelle) ;
- des pelotes de pollen des butineuses recueillies durant cet essai (perte de pollen pour la pollinisation).

Ces dernières années, on a observé un déclin des colonies d'abeilles. Les causes de ce phénomène, dénommé récemment 'syndrome d'effondrement des colonies', font débat. Mais il demeure que les apiculteurs subissent des pertes de colonies de plus en plus importantes, laissant ainsi de moins en moins disponibles pour la pollinisation des cultures. Par ailleurs, des insecticides existent aussi quant à l'impact qu'un trop grand nombre de colonies rassemblées sur un même territoire ont sur la faune d'abeilles sauvages. Pour ces deux raisons, il est recommandé de limiter le nombre de colonies d'abeilles domestiques par zone de pollinisation des cultures en vue de maximiser leur efficacité.

La région d'étude est divisée en unités géographiques, chacune ayant des caractéristiques climatiques et de culture différentes. Les unités sont : (i) pour les cultures maraîchères, (ii) pour les cultures fruitières, (iii) pour les cultures de céréales, (iv) pour les cultures de légumes secs, (v) pour les cultures de plantes à fleurs. Les unités sont : (i) pour les cultures maraîchères, (ii) pour les cultures fruitières, (iii) pour les cultures de céréales, (iv) pour les cultures de légumes secs, (v) pour les cultures de plantes à fleurs. Les unités sont : (i) pour les cultures maraîchères, (ii) pour les cultures fruitières, (iii) pour les cultures de céréales, (iv) pour les cultures de légumes secs, (v) pour les cultures de plantes à fleurs.



Figure 1. Les unités par implantations géographiques (www.avignon.inra.fr)

Sous cette quantité de pollen limitée et il est donc important de trouver des solutions afin d'améliorer l'activité pollinatrice des abeilles. C'est dans cet objectif qu'un premier essai sur l'impact d'un nourrissage au pollen a été réalisé en 2009. Deux colonies ont été introduites à 3 jours d'intervalle chacune dans un tunnel contenant une culture de melon monopole, et nourries avec du pollen au bout de huit jours. Tout au long de l'essai, la disponibilité en pollen et en nectar ainsi que l'activité de butinage des colonies ont été relevés. Un point important est que toutes l'analyse :

- des stigmates issus des fleurs en pollinisation libre (activité pollinatrice) ;
- des stigmates issus des fleurs n'ayant reçu qu'une seule visite d'abeille (efficacité pollinatrice individuelle) ;
- des peletes de pollen des butineuses recueillies durant cet essai (perte de pollen pour la pollinisation).

I- Présentation de l'INRA

1) L'INRA

L'INRA (Institut National de Recherche Agronomique) est le premier institut de recherche agronomique en Europe et le deuxième dans le monde. C'est un établissement public qui est placé sous la double tutelle du ministère délégué à l'Enseignement supérieur et à la Recherche et du ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Il a été créé en 1946, dans le cadre de la reconstruction nationale d'après-guerre et de la modernisation de l'agriculture française, afin de permettre une production importante pour atteindre l'autosuffisance alimentaire. Aujourd'hui ses objectifs sont différents. De nouvelles préoccupations sont apparues et s'intègrent dans les recherches de l'INRA : l'écologie, la gestion et la préservation des ressources naturelles et de la biodiversité, la viabilité économique et le bien-être social, le respect de l'animal.

2) Le centre de recherche d'Avignon

L'INRA possède une délégation dans chaque région et 21 centres régionaux dont celui d'Avignon, présidé par Michel Bariteau. Ce centre a été fondé en 1953 et compte huit sites principalement en Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, ainsi qu'en Rhône-Alpes et en Languedoc-Roussillon (Figure 1). Mais plus de 80% des 580 agents permanents sont concentrés sur Avignon. Le centre compte également 400 agents temporaires par an dont une centaine de thésards.

Après sa fondation, le centre a développé ses compétences autour des principales productions agricoles de la région. Il se spécialise dans l'amélioration et l'accroissement de la résistance aux pathogènes des fruits et des légumes. Puis il développe des programmes dans la conservation des produits récoltés et la maîtrise de leur transformation industrielle. A la fin des années soixante vient la thématique « forêts méditerranéennes ». Puis, dans le début des années soixante-dix se développe la modélisation des mécanismes physiques et biologiques du continuum sol-plante-atmosphère, puis l'apparition des biotechnologies et de la génomique.

Aujourd'hui le centre INRA d'Avignon comporte trois pôles de compétence majeurs :

- Production Horticole Intégrée (PHI)
- Adaptation au Changement Global (ACG)
- Santé des Plantes (à Sophia-Antipolis)

Mais d'autres activités sont également développées, c'est le cas du pôle Abeille.

Sur les 14 Unités de Recherche du centre, 7 sont des Unités Mixtes de Recherche (UMR) qui mènent leurs recherches en partenariat avec les Universités françaises et étrangères, notamment du bassin méditerranéen, les grands organismes de recherche, les organismes interprofessionnels et les industriels, les collectivités territoriales et services déconcentrés de l'Etat. Le centre INRA est l'un des partenaires de l'Agroparc (Technopôle régional agroalimentaire d'Avignon qui associe transfert et développement, enseignement, formation, recherche et implantation d'entreprises françaises et étrangères principalement orientées vers l'agriculture et l'agroalimentaire).

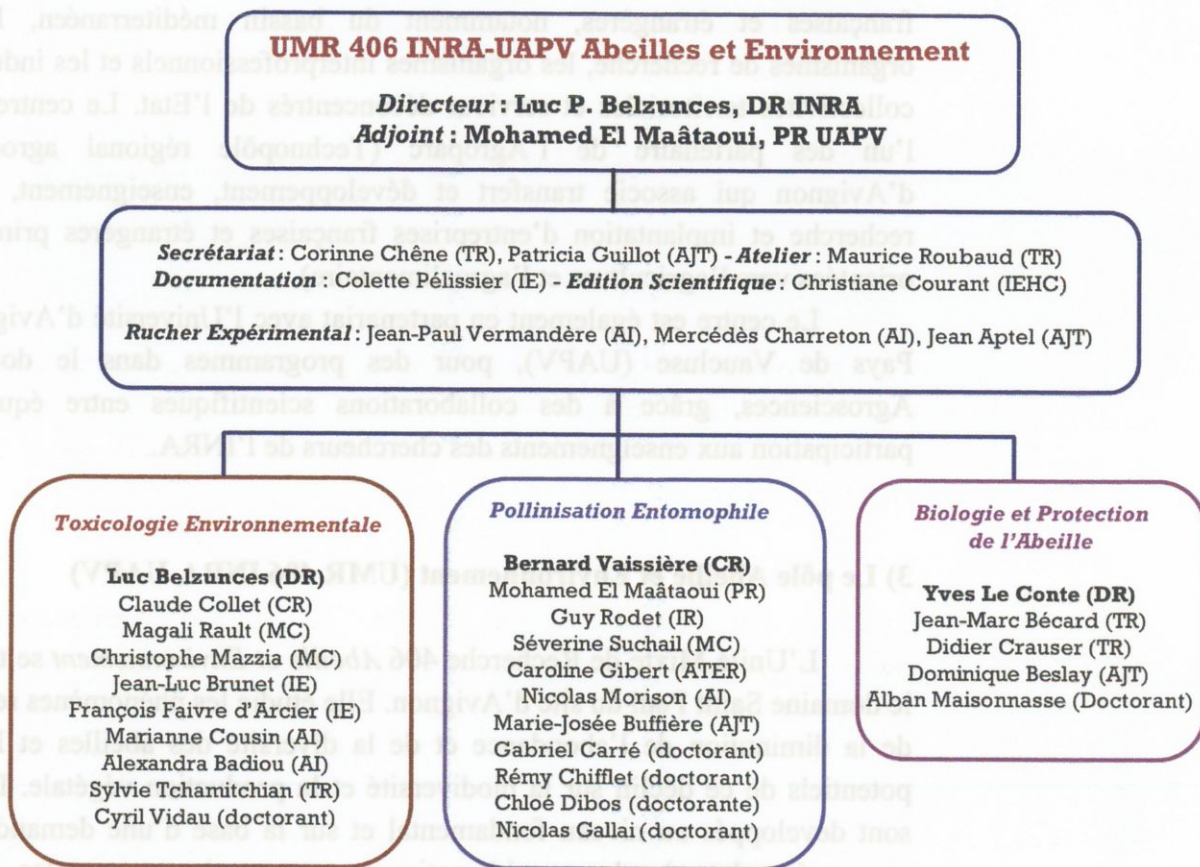
Le centre est également en partenariat avec l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (UAPV), pour des programmes dans le domaine des Agrosociétés, grâce à des collaborations scientifiques entre équipes et la participation aux enseignements des chercheurs de l'INRA.

3) Le pôle Abeille et Environnement (UMR 406 INRA-UAPV)

L'Unité Mixte de Recherche 406 *Abeille et Environnement* se trouve dans le domaine Saint Paul du site d'Avignon. Elle étudie les phénomènes responsables de la diminution de l'abondance et de la diversité des abeilles et les impacts potentiels de ce déclin sur la biodiversité et la production végétale. Les travaux sont développés au niveau fondamental et sur la base d'une demande sociétale pour répondre à des problématiques agro-environnementales et socio-économiques.

Ses principaux axes thématiques sont :

- Mécanismes, évolution et perturbations de la régulation sociale, comportementale et physiologique des colonies d'abeilles domestiques et du parasite *Varroa* ; phéromones, écologie chimique, lutte intégrée contre *Varroa*.
- Ecologie de la reproduction sexuée des plantes entomophiles ; butinage, efficacité pollinisatrice et interaction pollen-abeilles-pistil ; biochimie du nectar ; conduite des colonies d'abeille domestiques et de bourdons et conséquences sur leur activité pollinisatrice ; pollinisation et productions agricoles.
- Modes d'action des insecticides à faibles doses ; effets sublétaux délétères des toxiques environnementaux chez l'abeille domestique ; effets différentiels des pesticides ; physiologie du système neuromusculaire ; lombriciens ; écotoxicologie vis-à-vis des pesticides et polluants ; biomarqueurs



TR : Technicien de la recherche
 AJT : Adjoint technique
 IE : Ingénieur d'étude
 IEHC : Ingénieur d'étude hors classe
 DR : Directeur de recherches
 CR : Chargé de recherches
 MC : Maître de conférences
 AI : Assistant ingénieur
 PR : Professeur
 IR : Ingénieur de recherches
 ATER : Assistant technique à l'enseignement et à la recherche

Figure 2. Organigramme de l'UMR 406 (INRA Avignon, 2008)

biochimiques, physiologiques et comportementaux ; métabolisme des toxiques ; biodiversité des abeilles et paysage.

4) Le laboratoire de Pollinisation et Ecologie des Abeilles

Le Laboratoire de Pollinisation et Ecologie des Abeilles développe des actions de recherche sur les interactions plantes-abeilles en termes de pollinisation, qualité des productions végétales et maintien de la biodiversité.

Ses recherches s'organisent autour de quatre thèmes :

- Interactions pollen-abeilles-pistil : Biochimie des interactions pollen-abeilles-pistil et du nectar ; production, libération et qualité du pollen ; charges en pollen des insectes et incidence du vecteur (espèce et comportement) sur la viabilité et la longévité du pollen transporté ;

- Ecologie du butinage et activité pollinisatrice : Activité et comportements de butinage ; mise en place du butinage à l'échelle de la colonie chez les abeilles sociales ; répartition spatiale, fidélité et compétition intraspécifique et interspécifique chez l'abeille domestique ; modes de transfert du pollen (y compris intra-ruche) et activité pollinisatrice; dispersion du pollen et des gènes ;

- Biodiversité des abeilles et paysages : Incidence de la structure du paysage et des cultures entomophiles sur l'abondance et la biodiversité des abeilles ; écologie des abeilles sauvages ;

- Pollinisation et agriculture durable : Evaluation de l'impact de l'entomofaune pollinisatrice sur les rendements et la qualité des productions ; relations entre les caractères de la pollinisation (phénologie, intensité et qualité) et l'élaboration du rendement ; analyse des pratiques de pollinisation entomophile des cultures sous abri et de plein champ et élaboration de voies d'amélioration ;

Le Laboratoire de Pollinisation et Ecologie des Abeilles comprend 11 personnes (Figure 2) : Bernard Vaissière, chargé de recherche et animateur du laboratoire ; deux enseignants chercheurs, Mohamed El Maataoui et Séverine Suchail ; une assistante technique à l'enseignement et à la recherche (ATER), Caroline Gibert ; deux ingénieurs, Guy Rodet et Nicolas Morison ; une technicienne, Marie-Josée Buffière ; et quatre doctorants, Gabriel Carré, Rémy Chifflet, Chloée Dibos et Nicola Gallai.

II- Synthèse bibliographique

1) Les abeilles dans le règne animal

Les abeilles sont des insectes (classe Insecta) qui font partie de l'ordre des hyménoptères et du sous-ordre des aculéates. Ces derniers sont caractérisés par un aiguillon et par des comportements évolués comme creuser une galerie ou bâtir un nid. Parmi eux, on trouve les Apiformes qui constituent le groupe des abeilles au sens strict et qui regroupent 1000 espèces en France. Les abeilles se caractérisent par la présence de poils branchus sur leur cuticule et par une alimentation à base de nectar et de pollen (Vaissière et al. 2005). On distingue les Apiformes inférieurs, à langue courte, des Apiformes supérieurs à langue longue et auxquels appartient la famille des Apidae. L'abeille domestique, *Apis mellifera*, se distingue par la présence de poils entre les facettes de ses yeux, et par un comportement hautement social et la construction de cellules en cire pour l'élevage du couvain et le stockage des réserves de nourriture (Le Conte 2002). L'abeille domestique est élevée dans le monde entier pour produire du miel, mais aussi pour polliniser les cultures (Louveaux 1984).

2) La pollinisation entomophile

Chez les plantes à fleurs (phanérogames), la fécondation nécessite le rapprochement des gamètes mâles, constitués par les noyaux spermatiques issus des grains de pollen, et des gamètes femelles constitués des ovules. C'est ce transfert de pollen qu'on appelle la pollinisation. Elle peut être assurée par deux types de vecteurs : les vecteurs abiotiques que sont le vent, l'eau et la gravité, et les vecteurs biotiques, comme les chauve-souris, les oiseaux, mais surtout les insectes qui sont les principaux pollinisateurs des plantes zoophiles (plantes pollinisées par les animaux). Dans le cas des insectes, on parle de pollinisation entomophile.

Cette pollinisation entomophile se fait sur la base d'un mutualisme entre les fleurs et les insectes. Les insectes pollinisateurs participent à la reproduction des plantes de façon involontaire, le plus souvent pour trouver de la nourriture comme du nectar ou du pollen. La morphologie florale doit permettre l'accès à ces ressources et amener le pollinisateur à entrer en contact avec les organes sexuels, anthères ou stigmates, afin qu'il puisse se couvrir de pollen dans le premier cas et en déposer dans le second. Afin de pouvoir s'accrocher sur le corps de l'insecte, le pollen des plantes zoophiles est souvent recouvert de pollenkitt lipidique et porte des ornements.

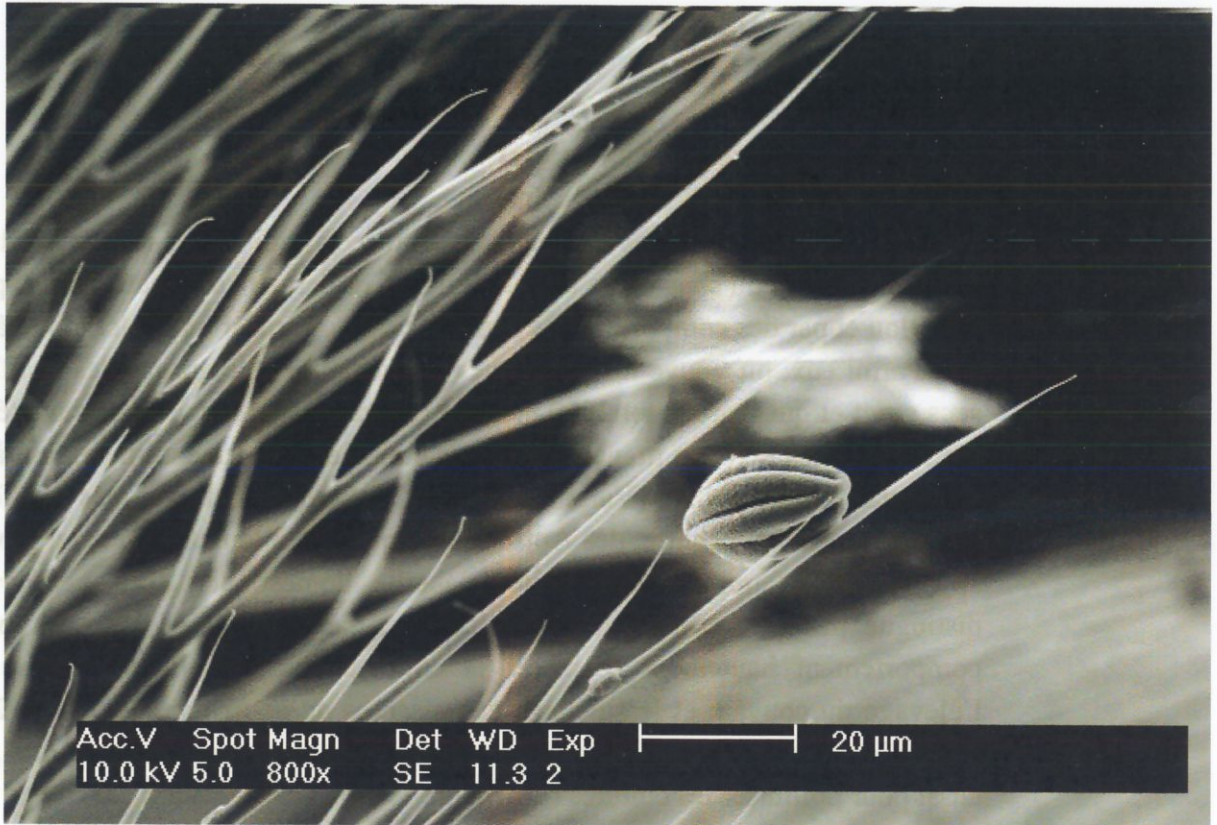


Figure 3. Grain de pollen pris dans les poils branchus d'une abeille, vu au microscope électronique (R. Chifflet et I. Bornard, INRA Avignon, 2007)

Pour assurer un taux de fécondation satisfaisant, les visites des fleurs doivent être suffisamment nombreuses (activité de butinage) et les insectes doivent transporter suffisamment de pollen de la même espèce lors de ces visites (efficacité pollinisatrice individuelle). Pour favoriser les échanges de pollen conspécifique, la fleur fidélise ses visiteurs grâce à sa morphologie, son parfum et sa couleur que l'abeille apprend lors de ses visites successives (Pham-Delègue 1999). La sécrétion de substances odorantes et de nectar doit intervenir pendant l'anthèse (période pendant laquelle la fleur est ouverte et fonctionnelle), mais le pistil de la fleur ne doit pas être abîmé ou détruit par ces visites successives.

3) Les abeilles, des pollinisateurs efficaces

Les hyménoptères, et tout particulièrement les abeilles, sont les insectes pollinisateurs dominants. Ces dernières jouent un rôle très important dans la biodiversité. En effet, plus de 20 000 espèces d'abeilles dans le monde contribuent à la survie et à l'évolution de plus de 80% des espèces végétales. Les abeilles (Apiformes) sont des pollinisateurs très efficaces et précis pour plusieurs raisons : (i) leur toison constituée de nombreux poils branchus leur permet de transporter des dizaines de milliers de grains de pollen et donc d'en déposer de grandes quantités sur les stigmates des fleurs (figure 3); (ii) les abeilles sont fidèles à une espèce de fleurs lors d'un voyage de butinage ; (iii) le pollen présent sur leur corps conserve sa viabilité pendant plusieurs heures ; et (v) elles visitent de très nombreuses fleurs car leur régime alimentaire consiste essentiellement de pollen et de nectar. En butinant de fleurs en fleurs, elles se déplacent d'un individu à un autre et vont ainsi permettre une bonne pollinisation croisée (Vaissière et al. 2005).

4) Abeille domestique et agriculture

La pollinisation est indispensable en agriculture car sans elle il n'y aurait pas de graines ni de fruits. Il existe quelques rares exceptions. Ainsi les espèces parthénocarpiques – par exemple la banane, certains agrumes (clémentines) et certaines variétés de concombre – sont capables de produire des fruits sans fécondation, et les espèces apomictiques (certaines graminées) sont capables de produire des graines sans fécondation. Mais pour la plupart des espèces, il faut une bonne pollinisation pour obtenir une production optimale de fruits et de graines de qualité. Ainsi chez le melon, une bonne pollinisation permet d'obtenir des fruits de plus bel aspect (forme bien symétrique) et dont la chair a une teneur plus élevée en sucre (Vaissière 2002).

Les abeilles sont essentielles à l'agriculture. La production de 84% des espèces cultivées en Europe dépend directement de la pollinisation par les insectes et plus particulièrement par les abeilles. Ces dernières sont utiles pour de très nombreuses cultures dans quatre secteurs principaux : l'arboriculture fruitière, les grandes cultures oléagineuses et protéagineuses, les cultures maraîchères et les cultures porte-graine (Vaissière et al. 2005). Pour assurer la pollinisation des cultures, les agriculteurs peuvent louer des colonies d'abeilles domestiques aux apiculteurs ou acheter des colonies de bourdons ou des pupes de mouches. L'élevage à grande échelle de l'abeille domestique par les apiculteurs dans le monde entier, leur butinage sur des espèces végétales très variées et l'adaptation rapide des colonies à des lieux différents, en font l'insecte pollinisateur le plus utilisé en agriculture. Dans la suite de ce rapport, abeille sera synonyme d'abeille domestique.

Mais les abeilles domestiques, comme toutes les espèces de la famille Apidae, agrègent leur récolte de pollen avec du nectar ou du miel sous forme de pelote et le pollen ainsi amassé ne participe plus à la pollinisation. De plus l'action des enzymes salivaires de l'abeille diminue sa qualité germinative (Serpeille 2003). Toutes les butineuses participent à la pollinisation, mais selon les espèces végétales, ce sont les butineuses de nectar ou de pollen qui sont les plus efficaces. Certaines plantes, comme le kiwi, ne produisent pas de nectar, leurs fleurs ne sont donc visitées que par des butineuses de pollen. Le fait de nourrir la colonie avec du sirop augmente le nombre de butineuses de pollen (Goodwin 1997), mais l'impact de cette technique sur la pollinisation reste à démontrer. Pour les productions de semences hybrides avec des plantes mâle-stériles qui ne fournissent pas de pollen, ce sont les butineuses de nectar qui sont les plus efficaces. Aucune méthode à ce jour n'a été mise au point pour améliorer l'activité pollinisatrice des colonies pour de telles cultures, mais l'orientation de l'activité de butinage d'une colonie vers la récolte de nectar pourrait constituer une piste intéressante.

5) Le butinage chez l'abeille domestique

Le pollen et le nectar sont à la base de l'alimentation des abeilles. Ils sont consommés en différentes proportions selon la saison, la caste et l'âge, et l'activité au sein de la colonie. Le nectar est composé essentiellement d'eau et de sucres. Transformés en miel par déshydratation et ajouts de sécrétions enzymatiques des abeilles, c'est un aliment énergétique. Le pollen couvre les besoins de la colonie en protéines et en lipides (acides aminés et acides gras essentiels) ainsi qu'en vitamines et en minéraux (Le Conte 2002). Le pollen constitue une part importante de la nourriture des jeunes abeilles nourrices qui vont élever le couvain et produire la gelée royale (Louveaux 1984).

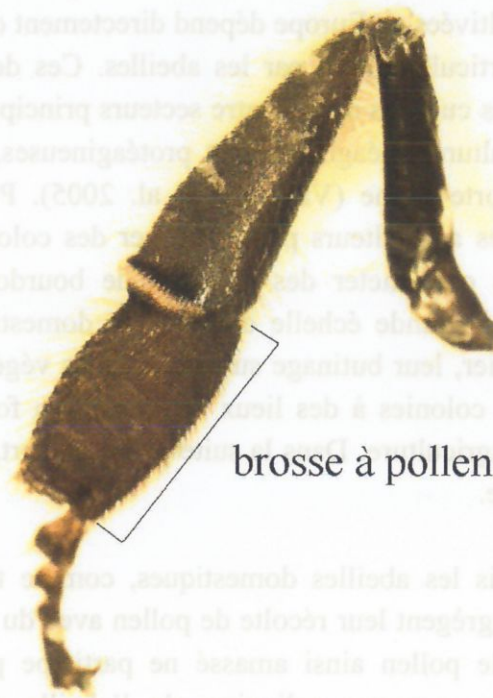


Figure 4. Face interne d'une patte postérieure chez l'abeille domestique (I. Boucaud, INRA Avignon, 2008)

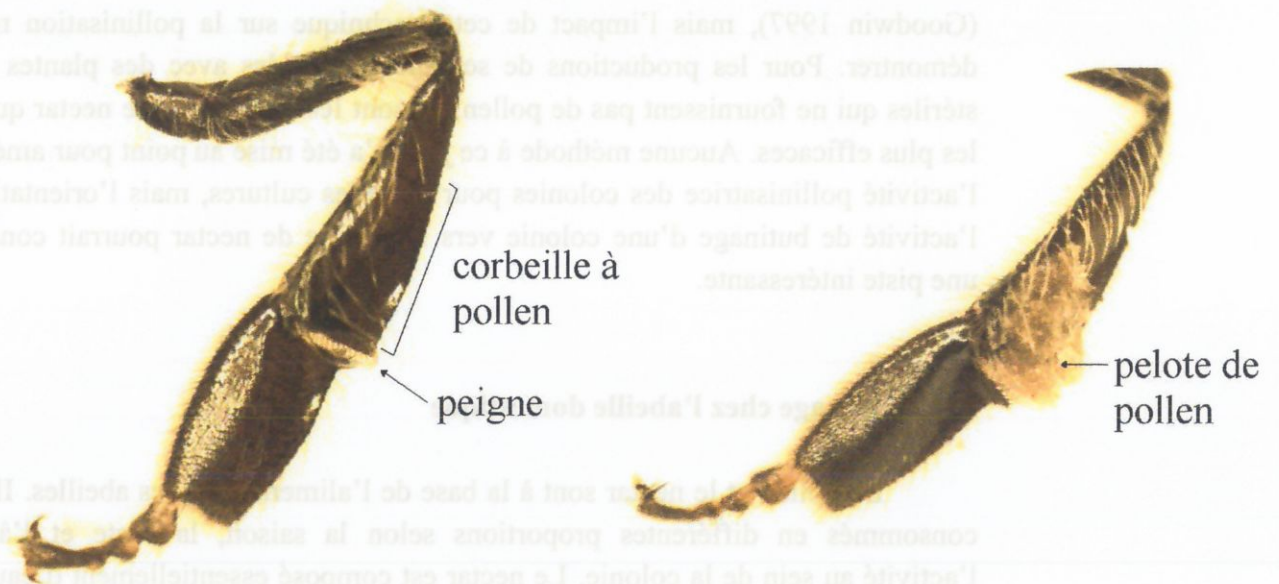


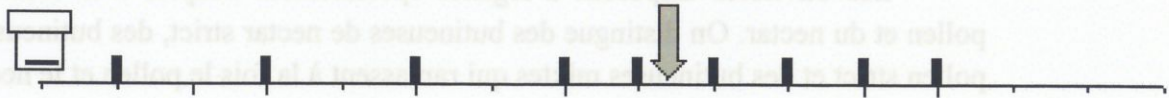
Figure 5. Face externe de pattes postérieures chez l'abeille domestique (I. Boucaud, INRA Avignon, 2008)

Les ouvrières disposent d'organes spécialement adaptés à la récolte du pollen et du nectar. On distingue des butineuses de nectar strict, des butineuses de pollen strict et des butineuses mixtes qui ramassent à la fois le pollen et le nectar.

Les nectaires floraux, c'est-à-dire les glandes qui sécrètent le nectar des fleurs, sont généralement situés au fond de la corolle. La butineuse doit donc pénétrer dans la fleur pour atteindre la sécrétion des nectaires floraux. L'extrémité de la langue de l'abeille est pourvue de poils et en forme de cuillère, ce qui lui permet de récolter de très petites quantités de nectar (Pham-Delègue 1999). Ce dernier est recueilli par capillarité et aspiré dans son jabot. Une fois de retour à la ruche, la butineuse transmet sa récolte aux abeilles manutentionnaires qui vont se charger de la stocker.

Pour récolter le pollen, les butineuses se frottent sur les anthères déhiscentes et le pollen s'accroche dans les poils qui recouvrent leur corps. Ce pollen est ensuite humecté avec du nectar avant d'être agrégé en pelotes. C'est grâce à des adaptations morphologiques particulières de leurs pattes qu'elles vont pouvoir récupérer ce pollen et constituer des pelotes. A l'aide de sa première paire de pattes, l'ouvrière rassemble le pollen accumulé dans la partie antérieure de son corps. Ce pollen est ensuite repris par la deuxième paire de pattes, qui nettoie également le pollen piégé sur le thorax et l'abdomen. Enfin le pollen est rassemblé dans les corbeilles sous forme de pelotes qui vont être ramenées à la ruche. Pour cela, au niveau de la troisième paire de pattes, l'abeille possède des brosses à pollen et des peignes formés d'une rangée de poils rigides sur la face interne tandis que la face externe du tibia postérieur est creusée en forme de corbeille, entourée de longs poils recourbés (Figures 4 et 5 ; Pham-Delègue 1999).

Tunnel 1



Tunnel 2

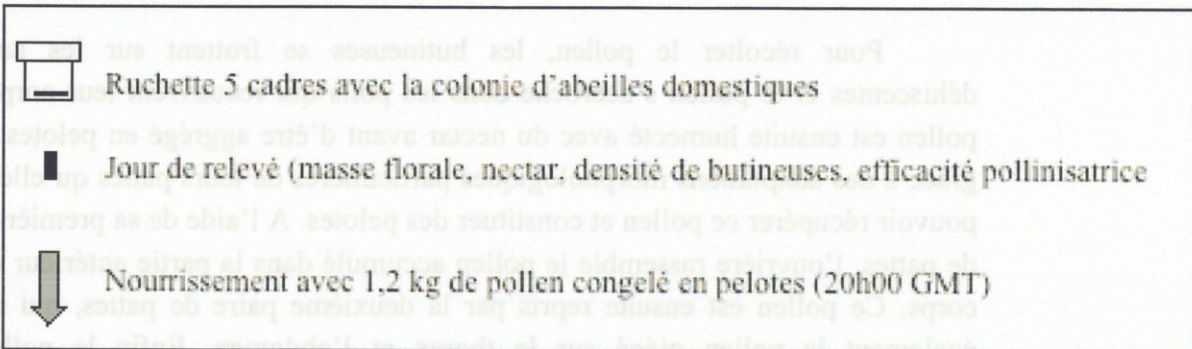
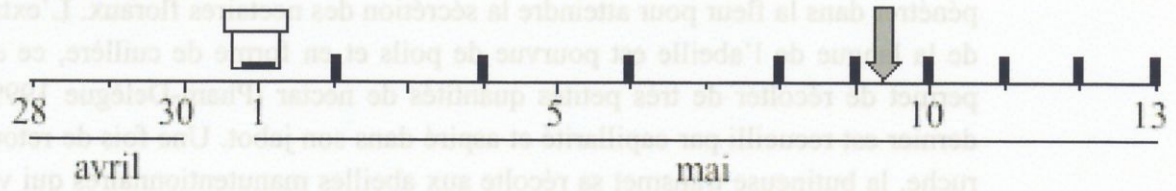


Figure 6. Calendrier de l'essai conduit en 2000.

III- Matériel et méthodes

Pour évaluer l'effet du nourrissage au pollen sur l'activité pollinisatrice des abeilles sous abri clos, nous avons utilisé un protocole basé sur la comparaison avant et après le nourrissage. Le dispositif expérimental était constitué d'un tunnel fermé dans lequel une colonie d'abeilles avec de très faibles réserves en pollen a été introduite et laissée en place pendant 8 jours. La colonie a ensuite été nourrie au pollen et son activité pollinisatrice a été suivie tous les deux jours à partir du lendemain de son introduction dans le tunnel, le jour du nourrissage et les 4 jours consécutifs après le nourrissage au pollen. Ce dispositif a été répété deux fois à 3 jours d'intervalle (Figure 6). Les variables dépendantes étaient la densité de butineuses totales et d'abeilles pourvues de pelotes de pollen, l'efficacité pollinisatrice individuelle et l'activité pollinisatrice totale. Parallèlement, nous avons effectué des relevés pour s'assurer que l'environnement dans chaque tunnel expérimental était bien similaire avant et après le nourrissage au pollen et n'avait pas induit d'effet confondant pour biaiser les résultats.

1) Tunnels expérimentaux

L'essai a été réalisé dans deux tunnels sur le site Saint-Paul de l'INRA d'Avignon (latitude 43° 54,825' Nord, longitude 4° 52,750' Est et altitude 32 m). Les deux tunnels étaient orientés est-ouest et distants de 10 m. Ils mesuraient 8 m x 22 m avec une hauteur maximale au faîtage de 3,2 m. Ces tunnels étaient recouverts d'un film de polyéthylène opalescent tri-couche thermique (Deltagri blanc ; Deltalène, Sainte Sigolène, F) mis en place en mars 1999. Chaque tunnel était pourvu de 5 ouvrants latéraux de chaque côté dont l'ouverture était recouverte de toile insectproof (toile polyéthylène à mailles carrées de 920 µm de vide de maille et 57% de surface ouverte ; ref. 22.30, Diatex, Saint Genis Laval) pour éviter les échanges d'abeilles des colonies expérimentales avec celles de l'extérieur. L'ouverture des ouvrants était asservie à un pilote de gestion du climat et elle intervenait dès que la température à l'intérieur des tunnels dépassait 25°C.

De nombreux paramètres sont modifiés dans l'environnement sous un abri clos, en particulier le rayonnement, la température, l'hygrométrie, et l'accessibilité aux ressources. La température et l'humidité relative dans chaque tunnel ont été mesurées par des capteurs autonomes, programmés avec un pas d'enregistrement de 15 min (HOBO Temp/RHTM; Onset Computer Corp., Bourne, USA). Ces capteurs étaient disposés au centre des tunnels, à une vingtaine de centimètres du sol dans un abri météo au milieu de la végétation. On

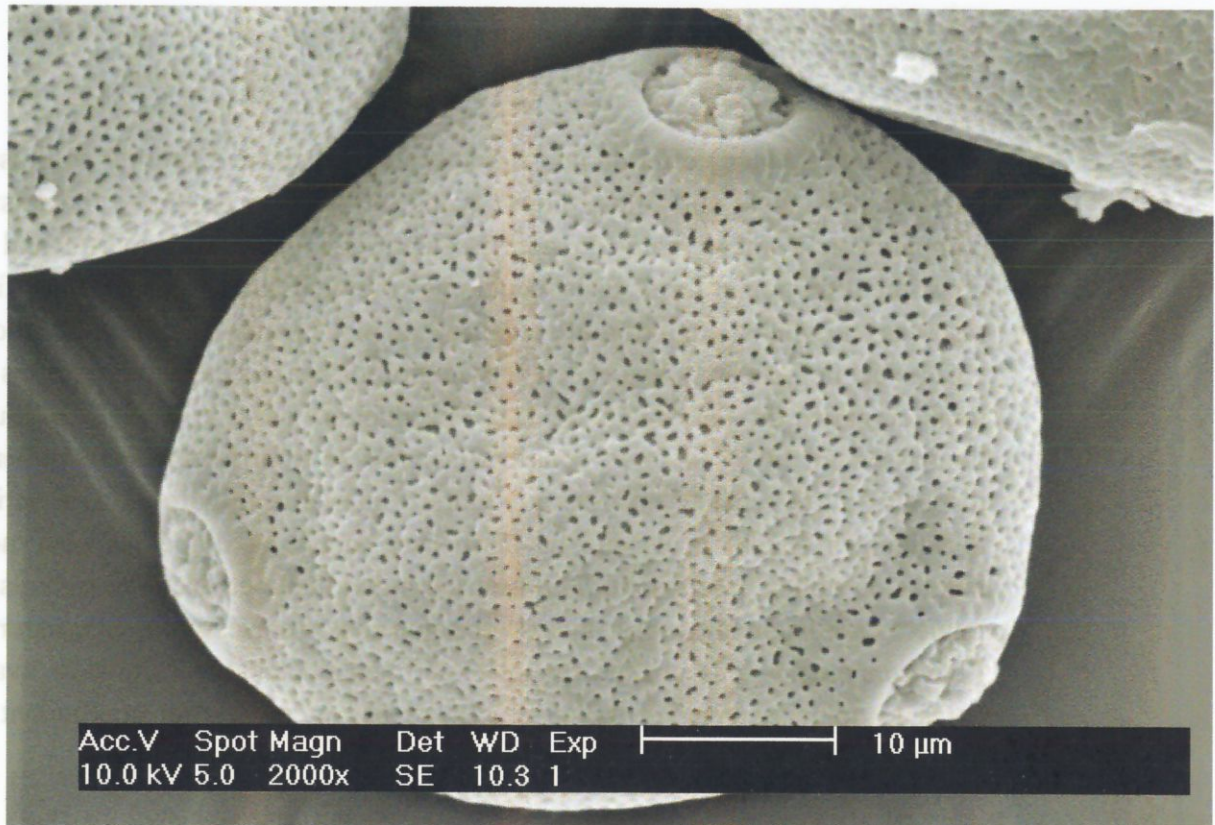


Figure 7. Grain de pollen de melon vu au microscope électronique (R. Chifflet et I. Bornard, INRA Avignon, 2007)

Tunnel	Population totale	Surface de			Nombre de cellules de pollen
		couvain ouvert	couvain operculé	miel operculé	
	abeilles	cm ²	cm ²	cm ²	
1	6700	1600	430	630	309
2	6000	1610	390	710	288

Tableau 1. Caractéristiques des colonies d'abeilles domestiques mises en place dans les 2 tunnels d'essai la veille de leur introduction.

a utilisé aussi les données de la station météorologique du centre INRA d'Avignon (STEFCE).

2) Supports biologiques de l'étude

a) Le modèle végétal

Le melon a été choisi comme modèle végétal car (i) c'est une culture communément conduite sous abri dans le Vaucluse et attractive pour les abeilles qui visitent ses fleurs pour y récolter nectar et pollen (Vaissière et al. 1996b), (ii) sa pollinisation est strictement entomophile, (iii) la plupart des variétés précoces actuelles sont monoïques et ce caractère permet de bien quantifier les flux efficaces de pollen qui parviennent sur les stigmates des fleurs femelles, (iv) les fleurs restent épanouies une seule journée ce qui permet de suivre l'activité pollinisatrice chaque jour sur une cohorte de fleurs différentes, (v) la croissance des fruits est rapide, et (vi) son pollen de grande taille avec une morphologie particulière (grains tripores à forme triangulaire et de 37 μm de diamètre sphérique équivalent, ce qui est élevé par rapport au pollen de la plupart des espèces – Stanghellini et al. 2002 ; Figure 7) qui permet de le reconnaître facilement et surtout de dénombrer ces grains de pollen de la culture cible avec une méthodologie (Annexe 1).

L'essai a été réalisé avec une culture de melon monoïque (variété Galoubet ; Ets. Gautier, Eyragues) plantée le 22 mars. Les plants ont été menés sur 2 bras et la culture a été conduite selon les pratiques usuelles pour le melon précoce sous abri froid. La densité de plantation était de 1,2 plante/m² avec 4 bancs de 30 plantes et de 1,4 m de large, et 0,6 m entre les plantes au sein d'un rang. Aucun traitement n'a été effectué avant ni pendant la présence des colonies d'abeilles dans les tunnels.

b) Les colonies d'abeilles domestiques

Au début de la floraison des fleurs femelles, on a apporté dans chaque tunnel à 7h00 (heure locale) une petite colonie d'abeilles domestiques dans une ruchette 5 cadres. Cette introduction a eu lieu le 28 avril dans le premier tunnel et le 1^{er} mai dans le second (Figure 6). Ces colonies ont été inspectées et préparées la veille de leur introduction pour évaluer leurs caractéristiques (Tableau 1). Pour cela, à la nuit tombée, on a changé quelques cadres de façon à constituer des colonies de taille semblable et à minimiser les provisions en pollen dont on a dénombré l'effectif de cellules (moins de 310 cellules par colonie introduite). On a secoué tous les cadres de chaque ruchette dans une boîte à essaim afin de mesurer le poids total d'abeilles de chaque colonie et on a ensuite prélevé un échantillon d'une centaine d'abeilles afin de déterminer le poids moyen d'un individu et calculer ainsi la population totale. Par ailleurs, pour chaque rayon on a

relevé la surface totale de couvain ouvert, de couvain fermé, et de miel operculé sur une plaque de plexiglass et ces surfaces ont ensuite été mesurées avec une table à digitaliser. Pour déterminer l'incidence du nourrissage au pollen sur l'activité pollinisatrice, au soir du 9^{ème} jour suivant leur mise en place, chaque colonie a été ouverte et elle a été nourrie avec 1,2 kg de pollen congelé. Il s'agissait de pollen d'abeilles récolté avec une trappe à pollen en 1999 et les pelotes ont été versées directement dans les cellules vides des cadres de bordure et autour du couvain operculé, après quoi on a pulvérisé ces cellules remplies de pollen avec du sirop (1:1 poids/vol.) pour assurer la cohésion des pelotes dans les cellules (Taber 1978). L'essai s'est poursuivi pendant 4 jours après ce nourrissage et en fin d'essai on a vérifié que la reine de ces 2 colonies était toujours bien vivante et en ponte.

Chaque colonie a été mise en place alors que les plantes étaient en début de pleine floraison afin d'avoir une bonne population de fleurs aussi bien mâles (pour le pollen) que femelles (pour suivre l'activité pollinisatrice) durant toute la durée de l'essai car la production de fleurs femelles chute très rapidement avec la nouaison et le développement des premiers fruits (Valantin-Morison *et al.* 2006). La ruche a été disposée dans la partie nord-est du tunnel. Un abreuvoir avec de l'eau a été placé à côté de chaque ruche pour couvrir les besoins de la colonie (nutrition et thermorégulation de la colonie; Morison *et al.*, 2000)

3) Variables relevées

a) - Disponibilité en pollen et ressources alimentaires pour les abeilles

Nous avons suivi l'évolution de la disponibilité en pollen pour les abeilles et pour la pollinisation ainsi que celle des ressources en nectar dans les tunnels pour s'assurer que l'environnement n'avait pas subi de changement significatif concomitant avec le nourrissage au pollen. Ces relevés nous ont aussi permis de comparer les conditions du déroulement de l'essai lors de chaque répétition, c'est-à-dire dans chaque tunnel.

Les ressources disponibles pour les butineuses ont été quantifiées tous les 2 jours à partir du lendemain de l'introduction des colonies et quotidiennement durant 4 jours à partir du jour du nourrissage au pollen en termes de masse florale (fleurs épanouies par tunnel et par jour) et de production nectarifère (volume de nectar par fleur et concentration en solides totaux dissous).

La masse florale a été mesurée sur 4 placettes de 1 m de rang réparties sur chaque rang et dans l'ensemble du tunnel. Sur chaque placette, on a dénombré les fleurs mâles et femelles épanouies chaque jour de relevé. La production nectarifère a été mesurée sur un échantillon de 5 fleurs de chaque type. Pour cela, on a repéré des fleurs en début d'anthèse chaque matin et ces fleurs ont été ensachées sous des sachets de tulle pour éviter que leur nectar ne soit prélevé par les abeilles. La production nectarifère a été mesurée à 14h00 pour éviter que le

nectar ne soit trop concentré pour son prélèvement. On a extrait le nectar avec des micropipettes de 10 µl et sa concentration en solides totaux dissous (sucres principalement) a été mesurée avec un réfractomètre portable (Bellingham & Stanley, Tunbridge Wells, Royaume Uni).

b) Activité pollinisatrice et butinage

L'activité pollinisatrice d'une espèce d'insecte donné vis-à-vis d'une espèce végétale autofertile peut être définie comme le nombre moyen de grains de pollen conspécifiques déposés par les individus de cette espèce sur les stigmates des fleurs visitées pendant leur période de réceptivité. Cette activité pollinisatrice est la résultante de deux composantes : l'activité de butinage d'une part, que l'on peut évaluer comme le nombre moyen de visites reçues par une fleur durant sa période de réceptivité, et qui est fonction de la durée de la période d'activité des butineuses, de la densité de butineuses rapportée au nombre de fleurs et de leur vitesse de butinage. Et d'autre part l'efficacité pollinisatrice individuelle des butineuses qui correspond au nombre moyen de grains de pollen conspécifiques déposés sur le stigmate d'une fleur lors d'une visite.

L'activité pollinisatrice globale a été évaluée par le nombre de grains de pollen de melon déposés sur les stigmates des fleurs en pollinisation libre pendant leur unique journée d'anthèse. Chaque jour, 10 fleurs femelles étaient repérées par une étiquette et laissées en pollinisation libre.

L'activité de butinage a été estimée par des relevés de densité de butineuses effectués à 10h00, 12h00, 14h00 et 16h00. Pour cela, on a noté l'effectif d'insectes présents dans un total de 200 fleurs épanouies par tunnel à raison de 50 fleurs dans la continuité de chaque placette de relevé de masse florale. La présence ou l'absence de pelotes était également notée lorsque cela était possible, de façon à préciser le comportement de butinage des abeilles (butineuses de nectar strict, sans pelote, ou butineuse mixte de nectar et de pollen, avec pelotes – Vaissière *et al.*, 1996).

Pour déterminer l'efficacité pollinisatrice individuelle des butineuses, on a repéré et étiqueté le matin de chaque date de relevé et dans chaque tunnel 10 fleurs femelles en début d'anthèse. Ces fleurs ont aussitôt été ensachées sous tulle avant que le butinage ne démarre pour éviter toute contamination pollinique et elles ont ensuite été exposées à une seule visite d'abeille, puis remise sous sachet de tulle.

Pour évaluer la quantité de pollen prélevée par les butineuses avec pelotes, un échantillon de 8 butineuses pourvues de pelotes a été capturé sur les fleurs femelles entre 10h00 et 10h30 pendant 4 jours consécutifs du 7 au 10 mai dans le tunnel T2. Pour cela, on repérait une fleur femelle avec une butineuse et un tube de verre borosilicaté (Kimble 4 dram ; <http://208.72.236.210/html/pg-60965.html>) était placé sur la corolle de la fleur. La butineuse montait dans le tube par phototactisme positif et était alors immédiatement anesthésiée avec du CO₂ puis

Grain de pollen

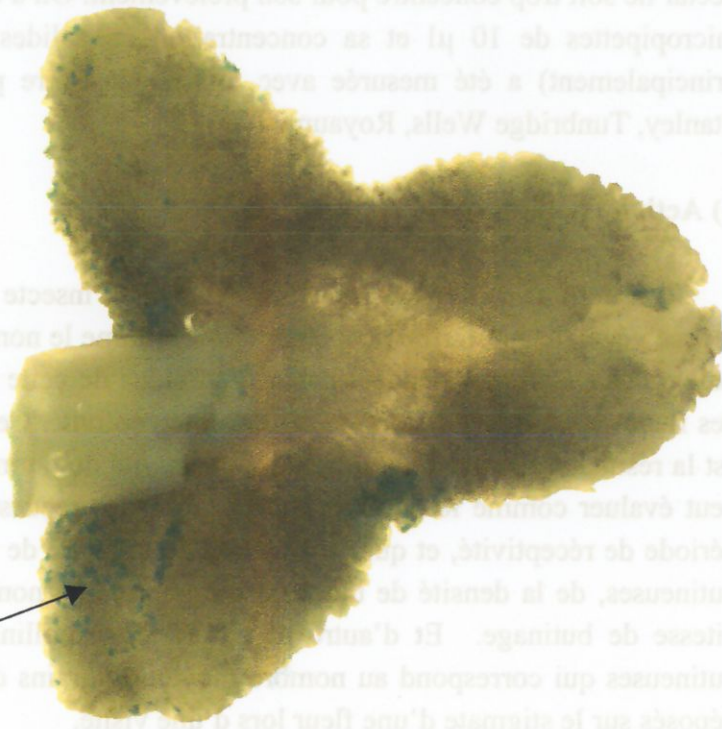


Figure 8. Stigmate de melon vu de dessous, après réhydratation et coloration au vert de malachite (I. Boucaud, INRA Avignon, 2008)

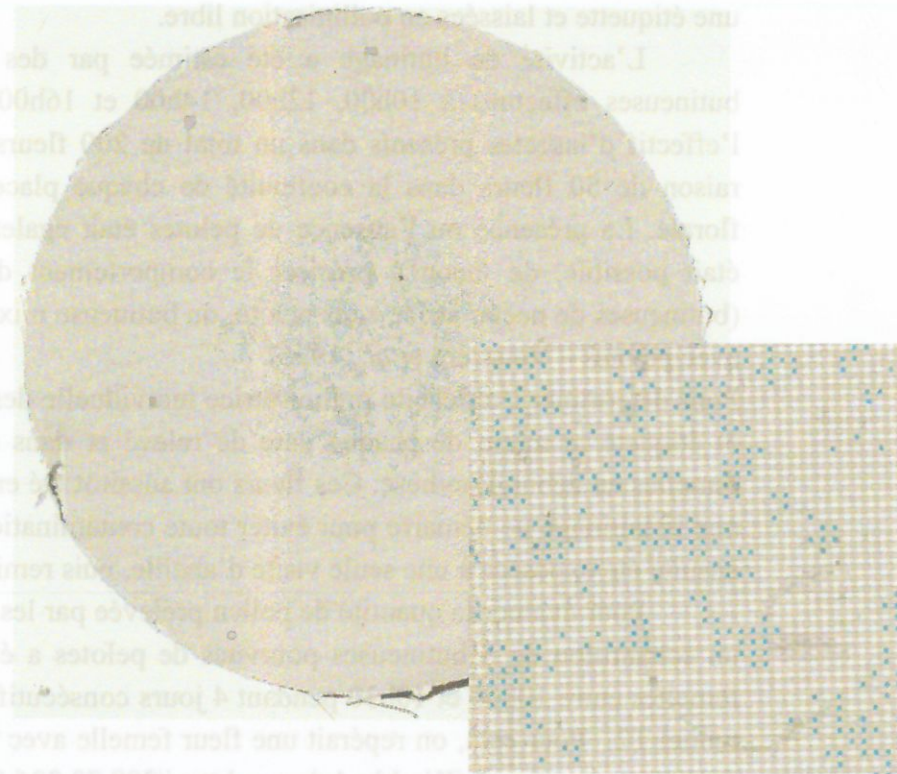


Figure 9. Grains de pollen (en vert) sur un filtre (I. Boucaud, INRA Avignon, 2008)

conservée au congélateur. On a ensuite retiré les pattes postérieures que l'on a placées à sécher dans une étuve à 40°C pendant 72 h et permettre leur conservation jusqu'à leur analyse.

c) Fructification

Pour maximiser la floraison femelle, toutes les plantes avec une fleur étiquetée ont été déchargées de tous leurs fruits ou ovaires noués tous les 3-4 jours pendant les 2 semaines de l'essai (Stanghellini et al. 2002). Par ailleurs, dans le but de maximiser la fructification des fleurs sélectionnées, pendant les 2 semaines de l'essai, on a utilisé des fleurs femelles uniquement sur les plantes sans aucun fruit noué ou sur celles avec un seul fruit issu d'une fleur pollinisée 5 jours au minimum avant la date d'anthèse de la fleur retenue. Dix jours après le dernier jour de relevés, les stigmates des fleurs étiquetées ont été récoltés individuellement dans des tubes Eppendorf qui étaient ensuite placés à l'étuve pendant 96 h à 40°C pour finir de sécher les stigmates et permettre leur conservation jusqu'à leur analyse.

Les fruits des fleurs étiquetées ont été récoltés à maturité, et on a noté à cette occasion le devenir de chaque fleur étiquetée en terme de fructification/coulure. Ces fruits ont été pesés, et pour chaque fruit on a extrait les graines et séparé les graines vides et pleines par une méthode densimétrique (Valantin-Morison et al. 2006).

d) Analyse des échantillons de stigmates et des pelotes de pollen

L'analyse de la charge en pollen des stigmates et des pelotes de pollen est fortement inspirée du protocole élaboré en 1996 par Vaissière et Froissart. Les protocoles ont été vérifiés par des comptages sous loupe binoculaire permettant d'établir une courbe de calibration du nombre de grains de pollen final par rapport au nombre de grains de pollen initial.

Extraction des grains de pollen du stigmate :

En préalable à l'extraction du pollen, chaque stigmate a été mis à tremper dans une solution de saline à 1% (poids/volume) colorée avec du vert de malachite à 0,1% (poids/volume ; Figure 8). Environ 20h plus tard, le stigmate était placé dans un tube en Annexela solution de saline et de vert de malachite. Ensuite le tube était passé une première fois à la sonde à ultrasons (Sonicator W-385 ; Heat Systems Ultrasonics, MISONIX inc, USA) avec une amplitude de 72 µm pendant 60s, la sonde étant placée à 5 mm du fond du tube. Puis le stigmate était retiré de la solution et examiné sous la loupe binoculaire (grossissement 25 ou 50) pour vérifier l'absence de grains de pollen résiduels. La suspension sans stigmate était soumise à un nouveau traitement à ultrasons. Elle était ensuite filtrée en une ou plusieurs fois, selon la quantité de pollen présente, afin d'avoir

un maximum de 6000 grains de pollen par filtre pour conserver une bonne précision dans le comptage. On effectuait la filtration avec une unité de filtration en verre fritté de 1,1cm² de surface filtrante et des filtres en polyamide à mailles de 30 µm (NITEX 03-30/18 de SEFAR-FYLTIS). Le filtre était ensuite placé sur une lame avec une goutte de glycérol (Annexes 2, 3 et 4 ; Figures 9).

Comptage des grains de pollen de melon :

Pour les stigmates qui ont été laissés en pollinisation libre, le dénombrement des grains de pollen de melon a été fait avec le logiciel d'analyse d'images IMAGEJ version 1,36b (Wayne Rasband, National Institut of Health, USA). Chaque lame avec le filtre et les grains de pollen de melon était d'abord numérisée avec un scanner (Super Coolscan 9000 ED ; Nikon France, Champigny-sur-Marne, F). Puis l'image était traitée avec le logiciel IMAGEJ. Tout d'abord, un seuillage par couleur permettait de conserver uniquement les couleurs dans les tons bleu-vert (couleur du pollen coloré au vert de malachite) et éliminer le maillage du filtre. Puis l'image était transformée en une image binaire (8 bits) et un seuillage par niveau de gris permettait de supprimer certains déchets. Enfin le comptage avait lieu pour des particules d'une taille minimale et maximale définie lors de la mise en place du protocole (taille minimale 18 pixels et taille maximale 80 pixels). Ce protocole a été vérifié sur plusieurs lames (comptage d'une même lame par scanner et ordinateur, comparé à des dénombrements visuels sous loupe binoculaire par différents expérimentateurs). Globalement, la précision du dénombrement était de $\pm 10\%$ (Annexes 5 et 6).

Pour les stigmates qui n'ont reçu qu'une seule visite d'abeille, le comptage se faisait visuellement sous une loupe binoculaire afin d'atteindre un taux d'erreur de $\pm 5\%$.

Analyse du contenu en pollen de melon des pelotes des abeilles :

L'analyse a été effectuée sur une seule patte postérieure par abeille. En pesant la patte avec la pelote, puis la patte seule, on déterminait le poids de la pelote. Cette dernière était ensuite placée dans un tube Kimble dans lequel on ajoutait 12 mL de saline à 1% (p/v) avec 100 µl de vert de malachite à 0,1% (p/v). Le tube était ensuite placé sous la sonde à ultrasons (sonicateur) à 20 kHz et avec une amplitude de 36 µm pendant 60 s, la sonde étant placée à 1 mm sous la surface du liquide. La solution était filtrée sur des filtres à maille de 30 µm et le nombre de filtre était adapté en fonction du poids de la pelote. Enfin, les filtres étaient déposés sur des lames de microscope, avec une goutte de glycérol puis scannés et le pollen était dénombré avec le logiciel d'analyse d'images IMAGEJ. (Annexe 7).

4) Statistiques

L'analyse statistique a été faite dans l'hypothèse d'une distribution normale pour toutes les variables continues en utilisant les techniques habituelles d'analyse de variances. Les dénombrements (nombre de fleurs par placette et nombre d'abeilles pour 400 fleurs) ont été analysés après une transformation $\sqrt{\quad}$, les proportions (proportion de fleurs femelles, de solides totaux dissous dans le nectar et d'abeilles avec pelotes) après une transformation $\text{Arcsin}\sqrt{\quad}$, et les charges en pollen de melon des stigmates après une transformation Log pour stabiliser la variance entre les groupes (Sokal & Rohlf, 1995). Le sexe d'une fleur (femelle ou mâle), l'heure de relevés pour les densités de butineuses et le traitement de nourrissage au pollen ont été considérés comme des facteurs fixes tandis que les facteurs tunnel, placette (masse florale) et date au sein de chaque période (avant et après le nourrissage) ont été considérés comme des facteurs aléatoires, sauf mention expresse autre. Les tableaux de contingence (fructification des fleurs étiquetées) avec au moins 5 observations attendues par cellule ont été analysés avec des tests de G (Sokal & Rohlf, 1995). Sinon on a calculé la probabilité significative (P) avec 10 000 répétitions d'une simulation pour calculer le rapport de vraisemblance (Tests de Monte-Carlo ; Engels, 1988). Les analyses ont été réalisées sur SYSTAT™ (Wilkinson, 1989). Les moyennes sont rapportées avec leur erreur standard et les valeurs sont indiquées comme étant significativement différentes si $P \leq 0,05$, sauf si mention expresse autre.



Figure 11. Evolution de la masse florale dans le tunnel T2. La flèche grise indique la date du nourrissage au pollen (le 9 mai au soir).

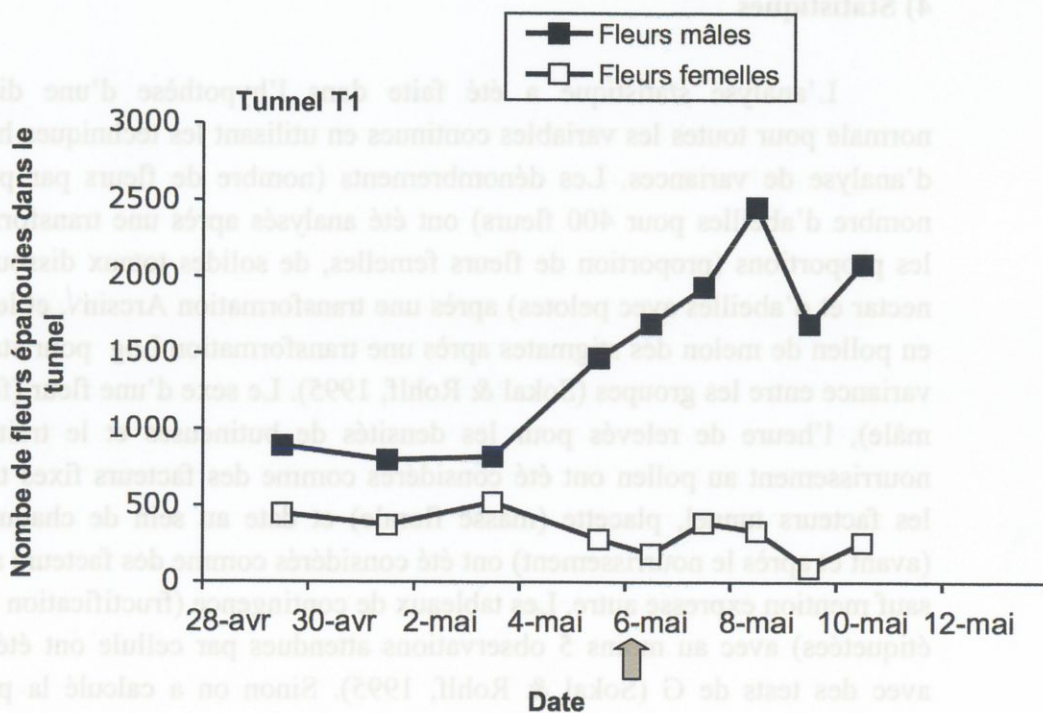


Figure 10. Evolution de la masse florale dans le tunnel T1. La flèche grise indique la date du nourrissage au pollen (le 6 mai au soir).

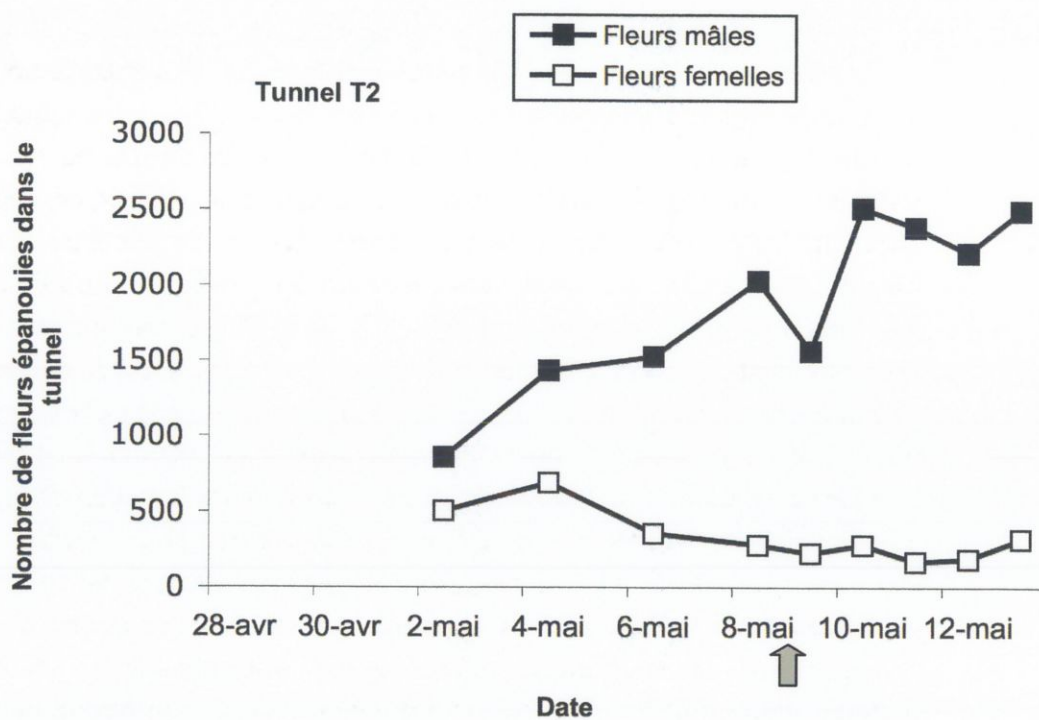


Figure 11. Evolution de la masse florale dans le tunnel T2. La flèche grise indique la date du nourrissage au pollen (le 9 mai au soir).

IV- Résultats et analyse

1) Environnement de l'essai

a) Environnement climatique

Les conditions météorologiques ont été globalement favorables pendant les 16 jours de l'essai avec 10 jours de temps ensoleillé (durée d'insolation ≥ 10 h), 4 jours de temps variable et de 2 jours de temps couvert : La durée d'insolation a été nulle le jour d'introduction de la colonie dans T1 avec 13 mm de précipitation (28 avril), et de seulement 12 min avec 22 mm de précipitation le premier jour suivant le nourrissage au pollen de la colonie dans T2 (10 mai). La température instantanée dans les tunnels a varié entre 11,4 et 34°C. Températures et hygrométrie ont été similaires dans les 2 tunnels, mais avec des températures légèrement plus élevées dans T1 que dans T2 (21,6 et 21,1 °C en moyenne, respectivement) accompagnée d'une hygrométrie plus faible (73,4 et 74,9% en moyenne, respectivement). Ces différences étaient significatives ($n = 1496$ relevés et $P < 0,001$), mais elles n'ont probablement pas été de nature à influencer les résultats car les conditions dans les 2 tunnels sont restées proches (écarts maximaux de 3,5°C et de 14% d'hygrométrie) avec une très bonne corrélation entre les valeurs dans les 2 tunnels ($r \geq 0,99$; $n = 1496$).

b) Masse florale et disponibilité en pollen

Durant l'essai, la masse florale a varié entre 1170 et 2800 fleurs par tunnel et la proportion de fleurs femelles a varié entre 7 et 37 %. Ces valeurs n'étaient pas homogènes sur l'ensemble de la période de relevés avec un effet date significatif, mais ceci était dû principalement aux conditions de début d'essai alors que les plantes commençaient à fleurir et les fleurs femelles représentaient plus de 30% de la masse florale totale lors des deux premiers jours de relevé dans les deux tunnels. Si l'on considère les 2 jours de relevé qui ont précédé le nourrissage des colonies et les 4 jours qui l'ont suivi, alors la masse florale et sa composition étaient uniformes sur ces 6 jours et dans chacun des 2 tunnels ($P \geq 0,08$). Le tunnel T1 comptait alors en moyenne 2100 fleurs dont 13% de fleurs femelles et le tunnel T2 2400 fleurs dont 10% de fleurs femelles. De ce fait, on a effectué les comparaisons d'activité pollinisatrice dans chaque tunnel en comparant les relevés des 2 jours avant le nourrissage par rapport aux 4 jours après ce nourrissage afin de se trouver dans des conditions similaires de floraison et de disponibilité en pollen. Durant cette période, l'effectif de fleurs femelles était similaire dans les deux tunnels avec une moyenne de 240 fleurs épanouies par tunnel et par jour. Par ailleurs, les 8 et 9 mai, la colonie dans le tunnel T1 avait été nourrie au pollen tandis que celle dans le tunnel T2 n'avait pas encore été nourrie (Figures 10 et 11). Sur l'ensemble de ces 2 jours, la masse

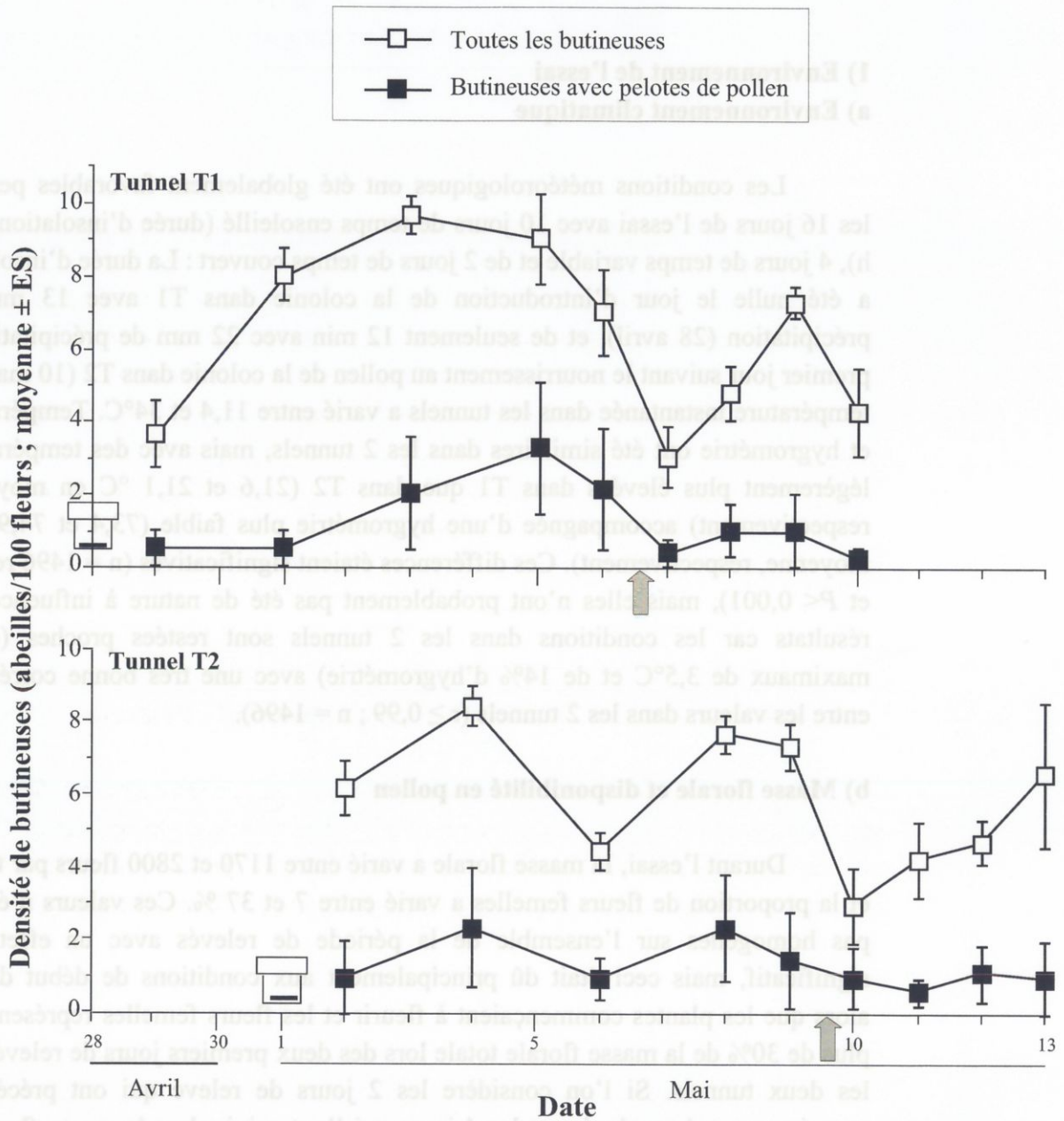


Figure 12. Effet du nourrissage au pollen sur l'activité de butinage et le type de ressource récoltée par les abeilles domestiques. La ruche indique la date de mise en place de la colonie dans le tunnel et la flèche grise la date du nourrissage au pollen (le 6 mai au soir dans T1 et le 9 mai au soir dans T2).

florale et la proportion de fleurs femelles étaient aussi similaires dans les 2 tunnels ($P \geq 0,40$) et ce résultat nous a permis aussi d'évaluer l'incidence du nourrissage sur l'activité pollinisatrice en comparant les résultats dans les 2 tunnels à ces 2 dates.

c) Production de nectar

La production de nectar a été en moyenne de 4,3 μ l par fleur mâle et de 11 μ l par fleur femelle avec des concentrations moyennes en sucres (solides totaux dissous) de 36% pour les 2 types de fleurs. Le type de fleur a eu un effet très significatif sur le volume de nectar produit, mais pas sur sa concentration et le facteur type de fleur n'a pas interagi de façon significative avec le tunnel ou avec la période de prélèvement : La production nectarifère est restée similaire tout au long de l'étude et dans les 2 tunnels sans différence significative entre la période qui a précédé le nourrissage des colonies et celle qui l'a suivi. Compte tenu de la similarité de la masse florale démontrée précédemment, on pourra donc considérer que les colonies ont eu des ressources butinables similaires durant les 2 jours de relevé avant le nourrissage au pollen et les 4 jours après, de même que dans les 2 tunnels les 8 et 9 mai.

2) L'activité pollinisatrice et l'efficacité pollinisatrice individuelle

L'environnement de l'essai a été constant en termes de masse florale, de proportion de fleurs femelles et de production nectarifère sur la période de 6 jours comprenant les 2 jours avant le nourrissage et les 4 jours de mesures qui l'ont suivi. L'effet du nourrissage au pollen sera donc préférentiellement évalué sur cette période.

a) Activité et comportement de butinage

Sur l'ensemble des relevés, nous avons examiné un total de 14 400 fleurs lors de 20 jours de relevés dans les 2 tunnels et nous avons observé 899 abeilles domestiques et aucune abeille sauvage. La densité moyenne journalière de butineuses était de 6,3 et 5,9 abeilles pour 100 fleurs dans T1 et T2, respectivement, avec des valeurs instantanées allant de 1 à 12 abeilles pour 100 fleurs. Lors des 2 jours avant le nourrissage et les 4 jours après, l'activité de butinage a varié fortement de sorte qu'elle est restée globalement similaire ($P \geq 0,08$), mais la densité des butineuses sans pelote de pollen a suivi une évolution similaire tandis que celle des butineuses qui récoltaient du pollen a diminué de façon significative dans les 2 tunnels ($P \leq 0,03$; Figure 12). Ainsi dans T1 on est passé d'une moyenne de 2,7 abeilles avec pelotes pour 100 fleurs avant le nourrissage à 0,7 abeilles avec pelotes pour 100 fleurs après le nourrissage, soit une réduction de 74%. Dans T2, on est passé de façon similaire de 1,9

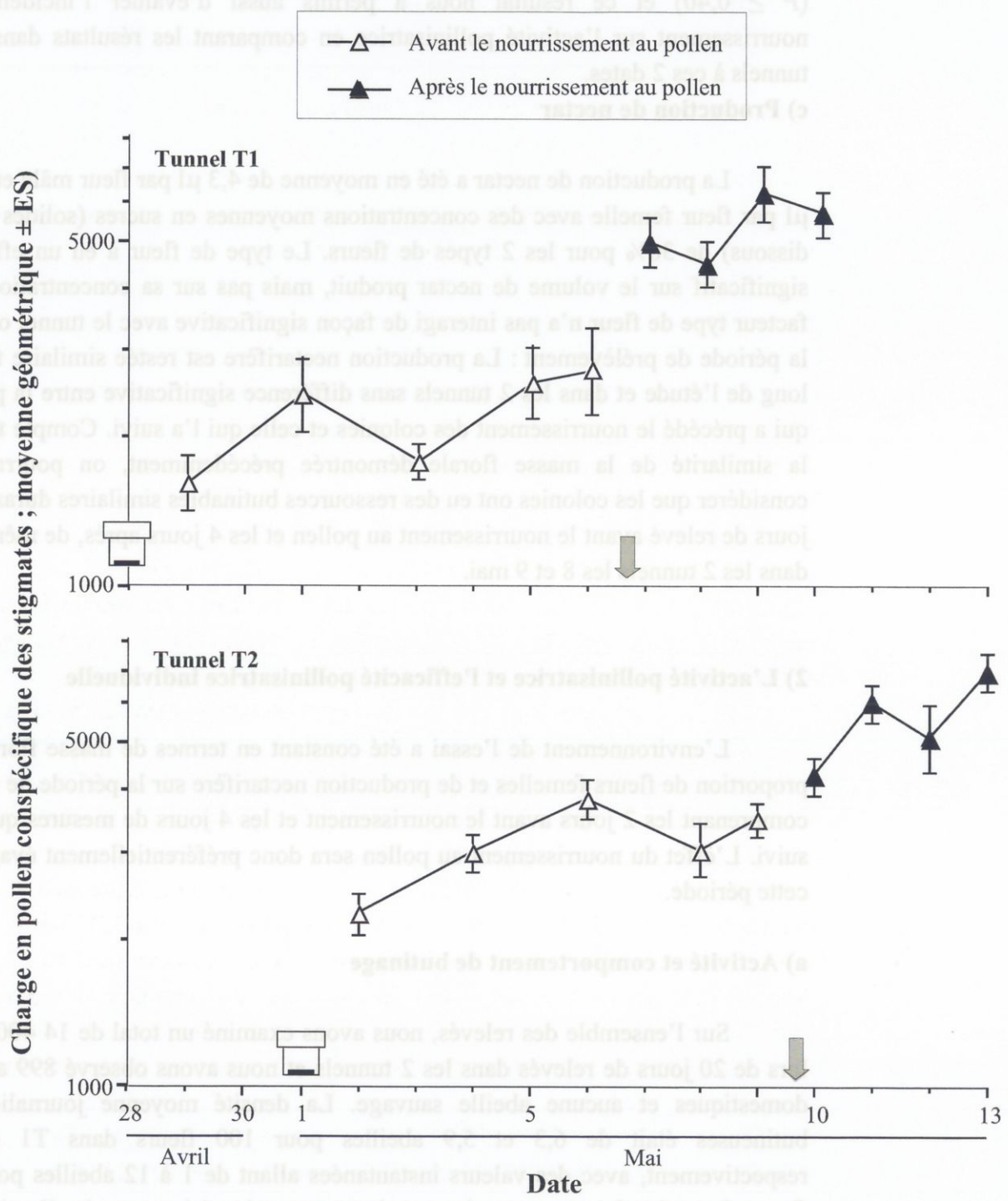


Figure 13. Effet du nourrissage au pollen de la colonie sur l'activité pollinisatrice des abeilles domestiques sur melon monoïque. La ruche indique la date de mise ne place de la colonie dans le tunnel et la flèche grise la date du nourrissage au pollen (le 6 mai au soir dans T1 et le 9 mai au soir dans T2).

abeilles avec pelotes pour 100 fleurs avant le nourrissage à 0,9 après, soit une baisse de 53%. Le nourrissage au pollen a donc bien eu pour effet de réduire le butinage du pollen de plus de moitié dans les deux tunnels. De même la récolte de pollen était plus faible les 8 et 9 mai dans T1, c'est-à-dire après le nourrissage au pollen, que dans T2 dans lequel la colonie n'avait pas encore été nourrie, mais cette différence n'était pas significative sur la seule base de nos 4 relevés effectués quotidiennement. Les densités faibles de butineuses observées les 6, 7 et 10 mai correspondent à une période où le temps était couvert et où la durée d'insolation n'a pas dépassé 3 h par jour.

b) Activité pollinisatrice

L'efficacité pollinisatrice globale a été mesurée par la charge en pollen de melon des stigmates des fleurs laissées en pollinisation libre pendant une journée. Cet effectif de grains de pollen par stigmate s'est avéré extrêmement variable et la distribution de cette variable était significativement différente d'une distribution normale et ce dans les deux tunnels ($P \leq 0,003$; test de Lilliefors). En prenant le logarithme de ces valeurs, on obtenait une distribution qui n'était plus significativement différente de celle d'une loi normale et c'est pourquoi toutes les analyses ont été effectuées sur le logarithme des valeurs obtenues et les moyennes rapportées sont les moyennes géométriques.

Dans T1, la moyenne des grains de pollen déposés sur les stigmates lors des 2 jours avant le nourrissage au pollen était de 2650 avec un minimum de 580 et un maximum de 5332 grains de pollen sur 18 stigmates. Après le nourrissage de la colonie, la moyenne sur 37 stigmates était de 5309 grains de pollen par stigmate, soit une augmentation moyenne de 100%, avec un minimum de 2449 et un maximum de 9755 grains de pollen et cette différence était très significative ($F = 36,605$; $ddl = 1,4$; $P = 0,0034$; Figure 13). Dans T2, la moyenne des charges en pollen déposées avant le nourrissage sur 18 stigmates était de 3255 grains avec des extrêmes allant de 1549 grains à 5595 grains de pollen de melon par stigmate, soit une augmentation moyenne de 72%. Après nourrissage, cette moyenne est passée à 5503 grains de pollen avec un minimum de 1967 grains de pollen et un maximum de 11025 grains de pollen déposés sur 37 stigmates. Ici encore, cette différence était significative ($F = 9,546$; $ddl = 1,4$; $P = 0,037$). Cet effet du nourrissage dans les deux tunnels a été confirmé par l'analyse combinée des périodes de 2 jours avant et 4 jours après le nourrissage pour les deux tunnels ensemble : l'effet date au sein de chaque période avant/après n'était globalement pas significatif et il n'y avait pas non plus d'effet tunnel ni d'interaction tunnel**période*, mais l'effet de la période avant/après était lui très significatif ($F = 35,779$; $ddl = 1,8$; $P = 0,0003$). De même, les 8 et 9 mai, la charge en pollen des stigmates du tunnel T1, dont la colonie avait reçu du pollen le 6 mai au soir, était de 5256 grains de pollen au lieu de 3255 grains de pollen dans le tunnel T2 dont la colonie n'avait alors pas encore

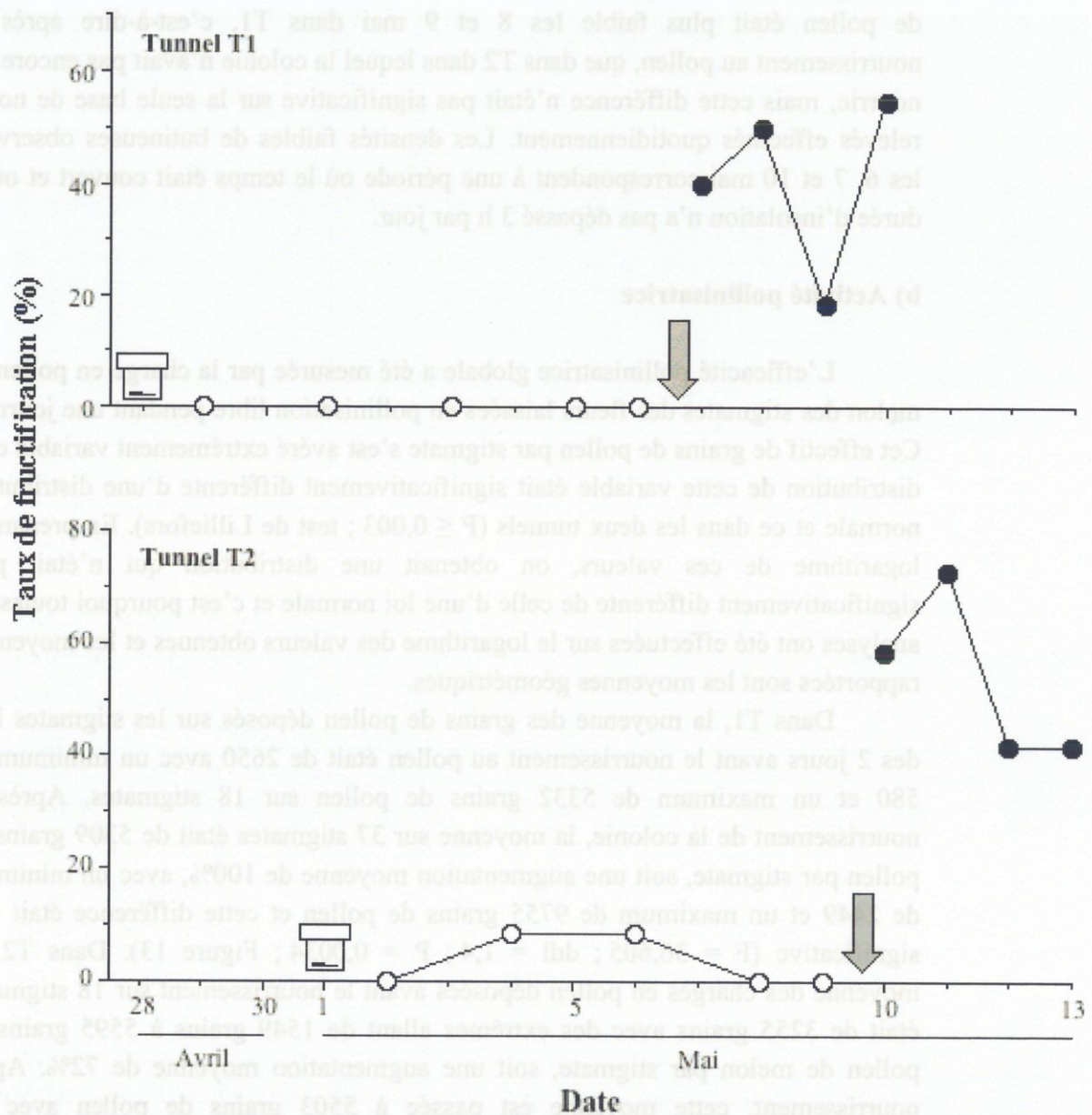


Figure 14. Effet du nourrissage au pollen de la colonie sur l'efficacité pollinisatrice individuelle des abeilles domestiques sur melon monoïque évaluée par le taux de fructification des fleurs ayant reçu une seule visite. Echantillon de 10 à 12 fleurs par date ; la ruche indique la date de mise ne place de la colonie dans le tunnel et la flèche indique la date du nourrissage au pollen.

été nourrie. Ici encore cette différence était très significative ($P = 0.0001$; Figure 13).

La fructification des fleurs en pollinisation libre est restée similaire lors des 9 jours de relevés dans chacun des tunnels ($P \geq 0,35$) avec une moyenne de 68,5% dans T1 et 86,5% dans T2. En particulier, le taux de fructification est resté similaire lors des périodes de 2 jours avant et 4 jours après le nourrissage au pollen ($G \leq 0,172$; $ddl = 1$; $P \geq 0,678$). Et dans les deux tunnels, la charge en pollen des stigmates des fleurs qui ont donné un fruit ou qui ont coulé était similaire ($P \geq 0,446$).

c) Efficacité pollinisatrice individuelle

On a déterminé la charge en pollen et le devenir d'un total de 194 fleurs femelles ayant reçu une seule visite d'abeille (95 dans le tunnel T1 et 99 dans le tunnel T2). Ces fleurs femelles ont toutes été exposées entre 10h20 et 11h40 (heure locale) et les heures d'exposition ont été similaires durant toute la durée de l'essai et dans les 2 tunnels. En particulier, il n'y a pas eu d'effet significatif de la période (avant/après nourrissage) sur l'heure d'exposition des fleurs (tests de Kruskal-Wallis) et les durées de butinage étaient aussi similaires entre ces périodes. Mais dans T1 comme dans T2, le nourrissage au pollen a eu un effet très significatif sur le nombre de grains de pollen de melon déposés sur le stigmate après une seule visite d'abeille, autrement dit sur l'efficacité pollinisatrice individuelle des butineuses ($P \leq 0,002$). Ainsi dans T1, la moyenne (géométrique) de la charge en pollen consécutive à une visite d'abeille était en moyenne de 34 grains lors des 2 jours avant le nourrissage et de 137 grains après le nourrissage, soit plus de 4 fois plus. Et dans T2, on a trouvé de façon similaire 43 grains lors des 2 jours avant le nourrissage et 169 grains après, soit près de 4 fois plus aussi.

Au sein de chaque période (avant et après nourrissage), la fructification de ces fleurs ayant reçu une seule visite d'abeille a été homogène entre les différentes dates et aussi entre les 2 tunnels ($P \geq 0,295$), mais le nourrissage au pollen a eu un effet considérable sur l'efficacité pollinisatrice (Figure 14). Si l'on examine plus particulièrement les résultats lors des 2 jours qui ont précédé le nourrissage par rapport aux 4 jours qui l'ont suivi, on est passé d'un taux de fructification pratiquement nul dans T1 comme dans T2 à un taux de 40 % dans T1 et de 53 % dans T2. Dans les 2 cas, cette différence est très significative ($G \geq 27$, $dl = 1$, $P < 0,0001$). De même, si l'on compare les résultats des 2 tunnels les 8 et 9 mai, le taux de fructification était de 0% dans le tunnel T2 avec la colonie non nourrie au lieu de 33 % dans le tunnel T1 avec la colonies nourrie le 6 mai au soir ($P = 0,0029$). Enfin il est intéressant de noter que la nature des ressources butinées n'a pas affecté l'efficacité pollinisatrice individuelle des abeilles car les taux de fructification ont été similaires après une visite d'abeille avec ou sans pelote de pollen dans les 2 tunnels.

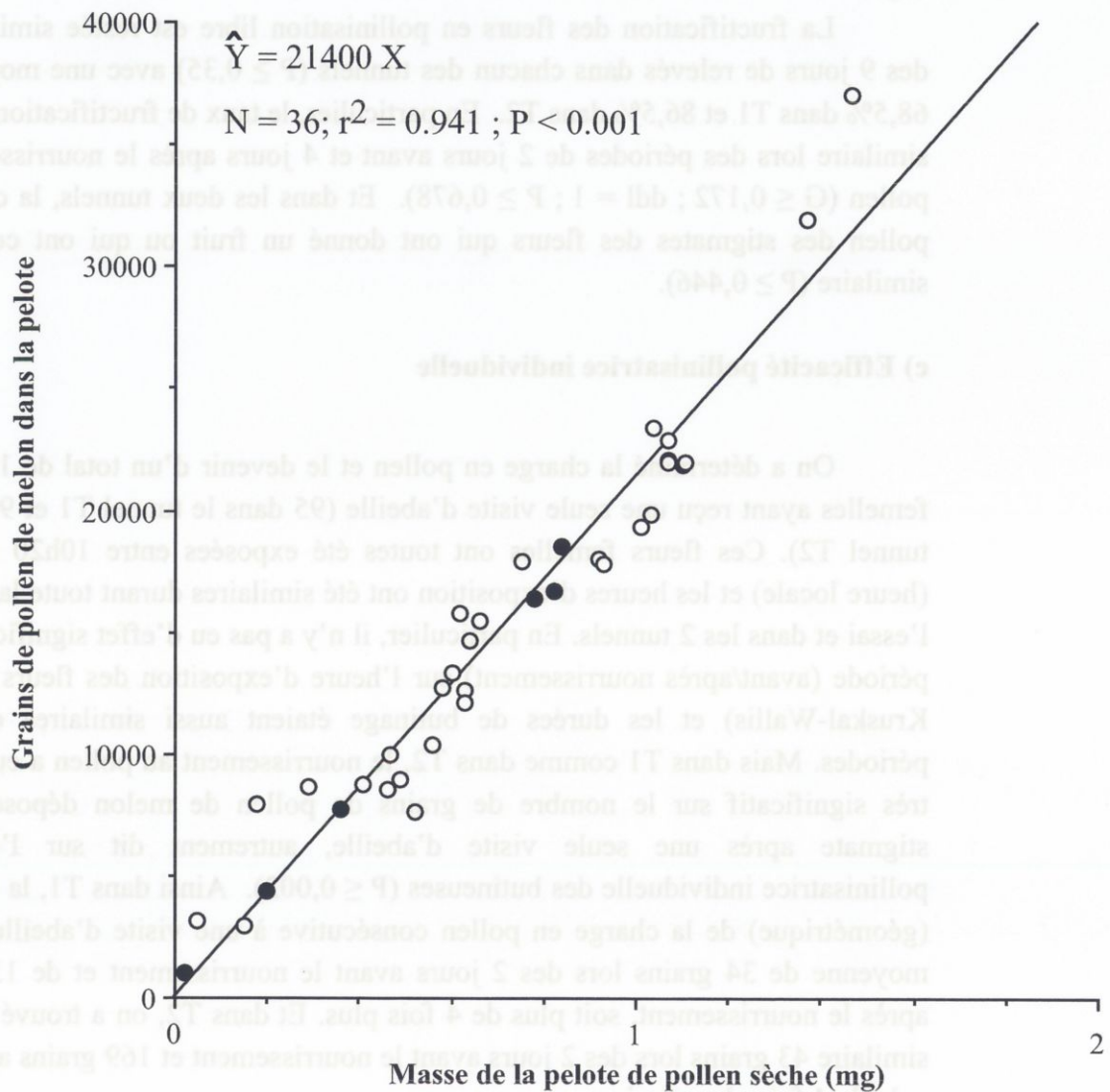


Figure 15. Contenu en pollen des pelotes collectées dans le tunnel de melon T2 avant (cercle vide) et après (cercle plein) le nourrissage au pollen

L'effectif de graines pleines dans ces fruits issus de fleurs femelles n'ayant reçu qu'une seule visite d'abeille était somme toute assez faible (moyenne de 173 graines pleines ± 11 ; $n = 45$) comparé au plus de 600 graines pleines des fruits en pollinisation libre. Mais les différences considérables observées en terme de fructification démontre que le pollen transporté par les abeilles des colonies nourries au pollen était viable et apte à féconder les ovules des fleurs au moins aussi bien que celui déposé par les abeilles avant le nourrissage au pollen. Ces résultats mettent donc en évidence l'importance du comportement de butinage individuel des butineuses sur leur efficacité pollinisatrice.

d) Contenu des pelotes en pollen

Nous avons analysé un total de 36 pelotes avec un poids sec allant de 0,02 à 1,47 mg. Ces valeurs sont faibles comparées à celles obtenues dans d'autres études (revue dans Vaissière & Vinson 1994). Le contenu en pollen de melon par mg de pelote n'a pas varié de façon significative avec la date lors des 3 jours qui ont précédé le nourrissage au pollen ($P = 0,213$) et il n'a pas varié non plus après le nourrissage au pollen comparé à avant ($P = 0,702$; Figure 15). Sur l'ensemble des données, nous avons trouvé qu'un milligramme de pelote sèche contenait en moyenne 21400 grains de pollen de melon. Cette valeur signifie que si l'on prend une charge maximale de 3 mg de pelote sèche, soit deux pelotes de 1,5 mg chacune sur la base de la valeur la plus élevée rencontrée, cette charge représentait 64200 grains de pollen. Enfin, il est intéressant de noter qu'il existait une corrélation négative très significative entre le poids d'une pelote de pollen et son contenu massique en pollen ($r = -0,482$; $n = 36$; $P = 0,0029$).

Conclusion

Le comptage du pollen présent dans les pelotes des butineuses a mis en évidence l'importance de la quantité de pollen récoltée par les abeilles et donc perdue pour la pollinisation du fait que ce pollen est agrégé en pelotes avec du nectar (Vaissière & Vinson 1994 ; Vaissière et al., 1996). Ainsi nous avons trouvé qu'un milligramme de pelote sèche récoltée dans un tunnel fermé de melon contenait en moyenne 21400 grains de pollen de cette espèce. La taille maximale des pelotes obtenues sur les pattes postérieures des butineuses en activité était de 1,47 mg, ce qui reste très faible sans doute du fait de la faible production en pollen des fleurs de melon et de la difficulté à extraire ce pollen du fait des poils glanduleux qui entourent la fente de déhiscence des anthères (Vaissière 1995). Une fleur mâle de melon produit environ 11 000 grains de pollen, mais tout ne peut pas être ramassé par les abeilles (Stanghellini et al., 2002). Si l'on prend l'hypothèse optimiste d'un taux d'extraction de 80% (Stanghellini et al., 2002), cela représente 8800 grains de pollen récoltables par fleur. Une charge de 3 mg de pelote sèche correspond à 64200 grains de pollen de melon d'après le contenu massique indiqué ci-dessus, et cela représenterait alors le contenu total en pollen disponible de plus de 7 fleurs. Ces chiffres montrent combien les conséquences de la récolte du pollen par les abeilles sont probablement souvent loin d'être négligeables. La réduction de la récolte en pollen par les abeilles pourrait donc être une solution afin d'améliorer la pollinisation des cultures sous abris clos.

L'essai de 2000 a montré une diminution brutale de plus de la moitié du nombre de butineuses de pollen suite au nourrissage au pollen de leur colonie. Ces résultats sont bien en accord avec ceux de Free (1967) et Moeller (1972) et ils sont aussi cohérents avec ce qui a été observé lors d'un nouvel essai sur le nourrissage au pollen réalisé en 2003. Les butineuses de nectar, ne se préoccupant pas de récolter activement le pollen sur leur corps pour le mettre en pelotes, seraient susceptibles d'avoir une charge en pollen plus importante sur leur corps que les butineuses de pollen. Elles seraient donc plus efficaces pour la pollinisation. Cette hypothèse pourrait être vérifiée dans l'avenir par l'analyse d'abeilles récoltées lors des essais sur le nourrissage au pollen. Sans aller jusque là, l'analyse des stigmates récoltés en 2000 a clairement mis en évidence qu'un nourrissage au pollen des colonies d'abeilles avait un effet positif sur la pollinisation. L'efficacité pollinisatrice individuelle des butineuses a augmenté en moyenne de 400% après le nourrissage au pollen tandis que l'activité pollinisatrice globale a augmenté de plus de 70% dans les deux essais. Ces résultats ont été confirmés depuis par d'autres essais. En 2006, on a observé une augmentation de 43% de l'activité pollinisatrice et en 2003, une augmentation de 63% de l'efficacité pollinisatrice individuelle. Les expériences ayant été faite dans des conditions différentes, aucune conclusion n'avait été tirée de leur

comparaison, mais l'analyse des stigmates de l'essai de 2000 montre qu'il existe bien une différence puisque l'activité pollinisatrice a augmenté de plus de 70% après le nourrissage au pollen des colonies alors que l'efficacité pollinisatrice individuelle a été multipliée par 4. Cette différence, qui peut paraître étonnante au premier abord, montre que l'activité pollinisatrice n'est pas le produit de l'activité de butinage et de l'efficacité pollinisatrice individuelle telles que nous avons pu les mesurer. En effet, les visites des fleurs ensachées sont notoirement plus longues que celles des fleurs en pollinisation libre car le nectar s'accumule dans les fleurs isolées des abeilles. De plus, si les abeilles peuvent déposer du pollen sur les stigmates en visitant les fleurs femelles, il est probable qu'elles peuvent aussi en retirer et que l'on parvient ainsi à un équilibre au fil des visites.

Nos résultats avec l'essai conduit en 2000 démontrent qu'un nourrissage au pollen des colonies d'abeilles domestiques présente un intérêt potentiel considérable pour la pollinisation des cultures sous abris. Cette méthode pourrait permettre d'améliorer les rendements en production de semences, en particulier pour les semences hybrides, et aussi d'améliorer la taille et la qualité des fruits lorsque le pollen peut faire défaut (pastèque triploïde par exemple). Pour appliquer ce traitement de façon optimale, il serait intéressant de déterminer plus précisément la quantité de pollen à apporter à la colonie ainsi que la fréquence des nourrissages, si plusieurs sont nécessaires. Dans le cas de notre essai, des relevés ont été effectués les quatre jours suivant le nourrissage au pollen, et on a pu observer un effet positif durant ces 4 jours. Les résultats de Moeller (1972) montre une réduction importante de la quantité de pollen ramené à la ruche par les abeilles jusqu'à huit jours après le nourrissage au pollen. Ces données seront à préciser dans l'avenir.

On a déterminé qu'il y avait en moyenne 240 fleurs femelles par tunnel durant les 2 jours qui ont précédé le nourrissage et les 4 jours consécutifs qui l'ont suivi et durant lesquels nous avons effectué des relevés. Si l'on prend l'exemple du tunnel T1, ce nourrissage s'est traduit par une augmentation de 2650 à 5300 grains de pollen par stigmate, soit 2650 grains de pollen en plus par stigmate. Cet effectif a été calculé sur 10 stigmates par jour et étendu à toutes les fleurs femelles, il représente 636 000 grains de pollen. A raison de 11 000 grains de pollen produits par fleur mâle qui sont disponibles à 80% (Stanghellini et al. 2002), chaque fleur mâle de melon constitue un pool d'environ 8800 grains de pollen disponibles. Autrement dit le gain d'activité pollinisatrice consécutif au nourrissage au pollen représente la production disponible de $(636000/8800)$, soit 72 fleurs mâles. Ce chiffre peut paraître ridicule au regard des 1860 fleurs mâles présentes en moyenne dans le tunnel pendant la période de comparaison avant/après nourrissage (cela représente 3,9% des fleurs). Mais il ne prend pas en compte l'efficacité de la récolte du pollen par les abeilles qui n'est certainement pas de 100% du fait des pertes durant le broyage et la mise en

pelotes des grains de pollen. Mais il illustre que la proportion du pollen des fleurs mâles qui parvient sur les stigmates est somme toute très faible (240 fleurs femelles avec 2650 grains de pollen rapportées à 1860 fleurs mâles produisant 11000 grains de pollen chacune, soit $636\ 0000 / 20\ 640\ 000 = 3,1\%$) et qu'une action au niveau de la colonie d'abeilles peut entraîner un changement somme toute assez faible de l'allocation du pool total de pollen dans le tunnel (3,1% ici) mais se traduire par une variation considérable en termes de flux de pollen efficace puisque la charge en pollen des stigmates est doublée. Cette quantification des flux de pollen est intéressante car elle permet de mieux comprendre les mécanismes de la pollinisation entomophile et c'est un avantage de travailler en milieu clos de pouvoir effectuer un tel suivi.

Conclusions personnelles

Ce stage a été une expérience très enrichissante et formatrice. Il m'a permis de découvrir la recherche avec la mise au point de protocoles, le travail sur le terrain comme en laboratoire, l'analyse des résultats et puis les aléas qui font que les expérimentations ne se déroulent pas toujours comme on l'aurait souhaité.

J'ai pu découvrir le milieu de l'apiculture, que je connaissais très mal, apprendre à marquer les abeilles et à manipuler les colonies. J'ai aussi pu comprendre à quel point les abeilles étaient importantes pour la biodiversité, les inquiétudes suscitées par leur disparition et les bouleversements que cela pourrait entraîner.

Le laboratoire a reçu régulièrement des visiteurs : des groupes d'apiculteurs, des équipes de journalistes de télévision. Devoir leur montrer et leur parler de mon travail a été une expérience très intéressante et m'a plu bien plus que je ne l'aurais imaginé.

Enfin ce stage m'a permis de faire la connaissance de personnes conviviales ayant des compétences et des parcours divers. Elles ont fait que ces quatre mois se sont agréablement déroulés.

Bibliographie

Dreller C. et Tarpy D.R. « Perception of the pollen need by foragers in a honeybee colony », *Animal Behaviour* n°59, 2000, pages 91-96

Engels W. Monte Carlo 2xN contingency table test, Genetics Department, Univ. Wisconsin, Madison, 1988

Free J.B. « Factor determining the collection of pollen by honeybee foragers », *Animal Behaviour* n°15, 1967, pages 134-144

Goodwin R.M. « Feeding sugar syrup to honey bee colonies to improve pollination: A review », *Bee World* n°78, 1997, pages 56-62

Le Conte Y. « La vie sociale de la colonie », *Le traité Rustica de l'Apiculture*, Rustica Editions, Paris, 2002, pages 52-83

Le Conte Y. « Mieux connaître l'abeille », *Le traité Rustica de l'Apiculture*, Rustica Editions, Paris, 2002, pages 12-51

Louveaux J. « L'abeille domestique dans ses relations avec les plantes cultivées », *Pollinisation et productions végétales*, INRA, Paris, 1984, pages 527-555

Moeller F.E. « Honey bee collection of corn pollen reduced by feeding pollen in the hive », *American Bee Journal* n°112, 1972, pages 210-212

Morison N. « Pollinisation de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) par l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) en production de semences hybrides sous abris grillagés », *Apidologie* n°31, 2000, pages 115-128

Pham-Delègue M.H. *Connaître et découvrir les Abeilles*, Minerva, Genève (Suisse), 1999

Serpeille A. « Les secrets d'une pollinisation efficace », *Bulletin Semences* n°174 novembre - décembre 2003, pages 36-39

Sokal R.R. & Rohlf F.J. *Biometry*, Editions W.H. Freeman San Francisco, 1995

Stanghellini M.S. ; Schultheis J.R. ; Ambrose J.T. « Pollen mobilization in selected cucurbitaceae and the putative effects of pollinator abundance on pollen depletion rates », *Journal of the American Society for Horticultural Science* n°127, 2002, pages 729-736

Taber S. « Rearing honey bees when you need them », American Bee Journal n°118, 1978, pages 408-411

Vaissière B. ; Morison N. ; Carré G. « Abeilles, pollinisation et biodiversité », Abeilles & Cie n°106 mars 2005, pages 10-14

Vaissière B. « La pollinisation », Le traité Rustica de l'Apiculture, Rustica Editions, Paris, 2002, pages 122-155

Vaissière B.E. ; Malaboef F. ; Rodet G. « Viability of cantaloup pollen carried by honeybees *Apis mellifera* varies with foraging behavior », Naturwissenschaften n°83, 1996, pages 84-86

Vaissière B.E. & Vinson S.B. « Pollen morphology and its collection effectiveness by honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera : Apidae), with special reference to upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. », Grana n°33, 1994, pages 128-138

Valantin-Morison M. ; Vaissière B. ; Gary C. et Robin P. « Source-sink balance affects reproductive development and fruit quality in cantaloup melon (*Cucumis melo* L.), Journal of Horticultural Science & Biotechnology n°81, 2006, pages 105-117

Wilkinson L. SYSTAT : the system for statistics. Systat, inc. Evanston, IL, 1989

Liste des annexes

Annexe 1. Coupe longitudinale d'une fleur femelle (A) et d'une fleur mâle (B) de melon *Cucumis melo* L. (adapté de Mc Gregor, 1976)

Annexe 2. Illustration du dispositif d'extraction des grains de pollen des stigmates

Annexe 3. Protocole de séparation des grains de pollen des stigmates de melon *Cucumis melo*

Annexe 4. Protocole d'analyse des stigmates de melon n'ayant reçu qu'une seule visite d'abeille

Annexe 5. Protocole de comptage des grains de pollen : Utilisation du logiciel d'imagerie ImageJ 1.36b

Annexe 6. Protocole de comptage des grains de pollen des pelotes de melon: Utilisation du logiciel d'imagerie ImageJ 1.36b

Annexe 7. Protocole pour déterminer l'effectif de grains de pollen des pelotes de pollen de melon

Liste des annexes

Annexe 1. Coupe longitudinale d'une fleur femelle (A) et d'une fleur mâle (B) de melon *Cucumis melo* L. (adapté de Mc Gregor, 1976)

Annexe 2. Illustration du dispositif d'extraction des grains de pollen des stigmates

Annexe 3. Protocole de séparation des grains de pollen des stigmates de melon *Cucumis melo*

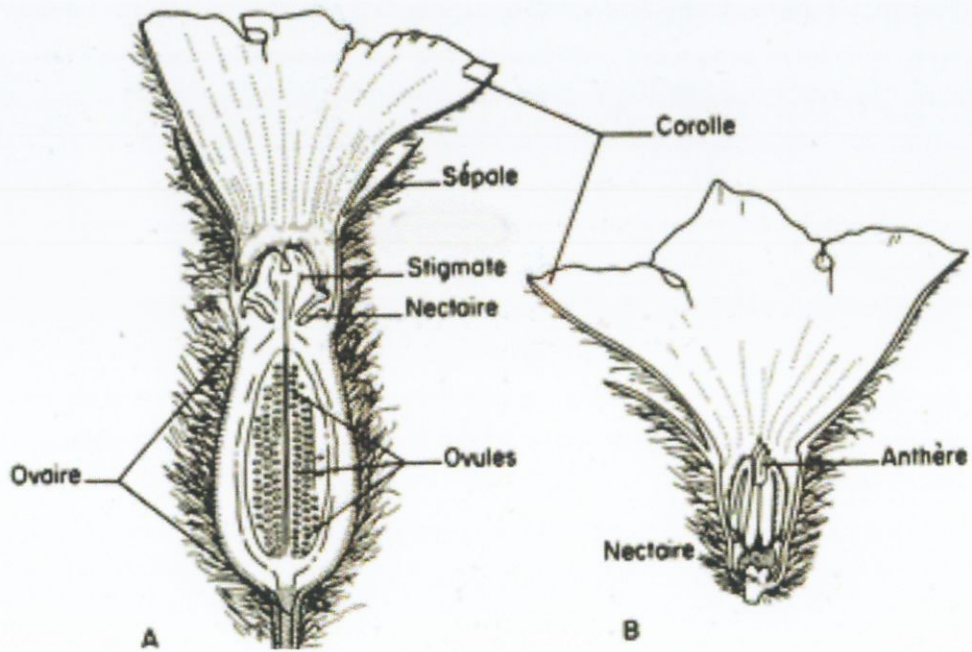
Annexe 4. Protocole d'analyse des stigmates de melon n'ayant reçu qu'une seule visite d'abeille

Annexe 5. Protocole de comptage des grains de pollen : Utilisation du logiciel d'imagerie ImageJ 1.36b

Annexe 6. Protocole de comptage des grains de pollen des pelotes de melon: Utilisation du logiciel d'imagerie ImageJ 1.36b

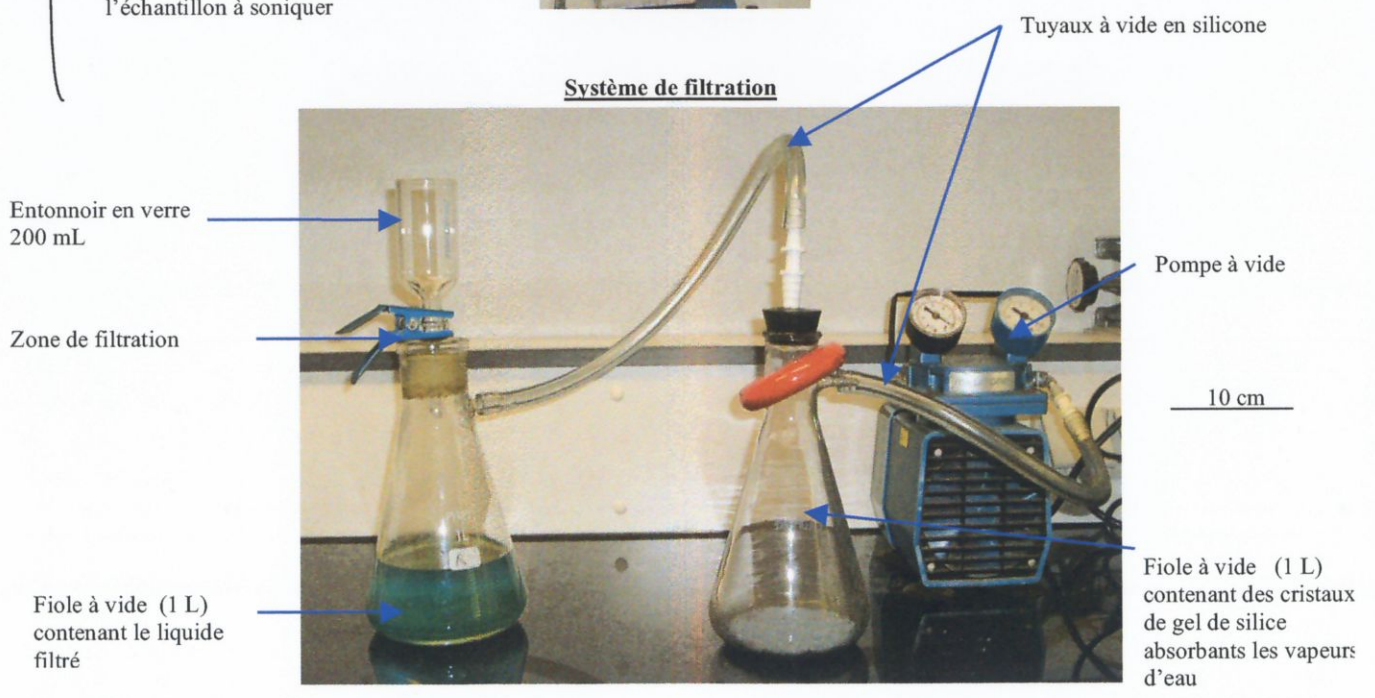
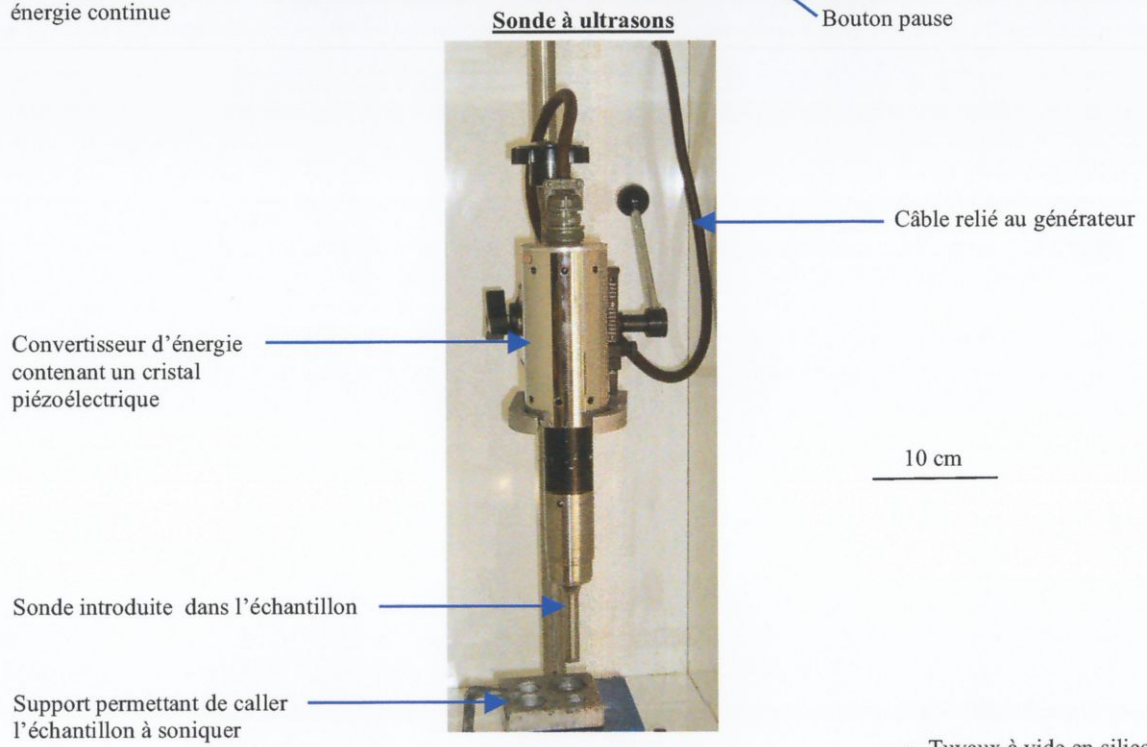
Annexe 7. Protocole pour déterminer l'effectif de grains de pollen des pelotes de pollen de melon

Annexe 1. Coupe longitudinale d'une fleur femelle (A) et d'une fleur mâle (B) de melon *Cucumis melo* L. (adapté de Mc Gregor, 1976)



Annexe 2. Illustration du dispositif d'extraction des grains de pollen des stigmates

SONICATEUR
W
3
8
5



Annexe 3. Protocole de séparation des grains de pollen des stigmates de melon *Cucumis melo*

Protocole élaboré par Nicolas MORISON & Bernard VAISSIERE et mis au point par Stéphanie PETITCUNOT en 2006 inspirée par B. VAISSIERE 1991 et B. VAISSIERE et R. FROISSART en 1996. Amélioré par Damien FAU et Fabien BALAGUER en 2007 et Vincent THUNIN puis Ingrid BOUCAUD en 2008.

Consommables

- Saline à 1% poids/vol. filtrée à 30 µm.
Peser 20 g de chlorure de sodium dans une fiole jaugée de 2 L, puis remplir la fiole d'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Placer la fiole sur une plaque avec un barreau d'agitation jusqu'à obtenir une solution limpide, c'est-à-dire jusqu'à ce que l'intégralité du sel soit dissout. Filtrer la solution sur un dispositif de filtration sous vide avec un filtre de 30 µm de vide de maille ;
- Solution de vert de malachite 0,1% poids/poids filtrée à 10 µm pour éliminer les débris ;
- Toile filtrante NITEX 03-30/18 (vide de mailles de 30 µm) de SEFAR-FYLTIS ;
- Disque de toile filtrante découpé avec un poinçon de 22 mm sur une plaque de plexiglass ;
- Solution de glycérol à 50% vol./vol.

Mode opératoire

1. Préparation des stigmates

1. Préparer une solution de saline colorée : Verser 10 mL de solution saline à 1% avec la dispensette III Organic et ajouter 20 µL de solution de vert de malachite (utiliser le PIPETMAN P20 de 20 µl) dans un tube en verre borosilicaté de 15 mL (modèle 60965 – <http://208.72.236.210/html/pg-60965.html> ; KIMBLE, Vineland, NJ) ;
2. Homogénéiser la solution saline colorée en l'agitant légèrement en tournant ou en plaçant le tube KIMBLE contenant la solution dans le bac à ultrason BRANSON 1510 réglé en mode sonication pendant environ 10 secondes ;
3. Utiliser le Pipetman P1000 pour remplir grossièrement avec environ 1,2 ml de la solution ainsi préparée chaque tube Eppendorf contenant un stigmate sec à analyser (préparer à nouveau de la saline colorée si nécessaire en répétant les étapes 1 et 2), ajuster à la graduation 1,5 mL des tubes Eppendorf.
4. Vérifier la bonne étanchéité des tubes Eppendorf, puis les placer dans la rôtissoire. Démarrer le chronomètre afin de pouvoir noter ultérieurement la durée de trempage des stigmates. Laisser tremper les stigmates une vingtaine d'heures environ à température ambiante ;

2. Préparation des filtres de pollen pour le comptage

5. Placer un disque de filtre sur le support en verre fritté du système de filtration.
Juste avant analyse, insérer le contenu du tube Eppendorf dans un tube KIMBLE, récupérer le stigmate avec la pince et le placer également dans le tube. Ajouter 10 mL de Solution saline (Dispensette III Organic) puis 20 μ L de Vert de Malachite ;
Rincer la pince et le tube Eppendorf au-dessus du filtre ;
6. Effectuer un premier traitement avec la sonde à ultrasons (SONICATOR W385 ; Misonix, New-York, USA) { bas de la sonde à 5 mm du fond du tube ; amplitude = 72 μ m ; durée 60 s}. S'assurer avant le traitement que l'extrémité de la sonde présente une surface brillante, sinon la passer au papier de verre ;
7. Après ce premier traitement de sonication, retirer le tube et le remplacer par un tube vide pour permettre à la sonde de s'égoutter, ce tube servant ensuite à récupérer les eaux de rinçage de la sonde ;
8. Retirer le stigmate du tube où il se trouve puis le rincer au-dessus du filtre et le placer entre deux lames. Bien presser les lames pour écraser le stigmate et vérifier sous la loupe binoculaire qu'il n'y ait plus de grains de pollen dessus (grossissement x25 ou x50) ;
S'il reste un nombre acceptable de grains de pollen (moins de 200), réaliser un comptage visuel, sinon mettre le stigmate dans un tube KIMBLE comme à l'étape 5 et effectuer un nouveau traitement de sonication ;
Si le stigmate a explosé durant la première sonication, passer directement à l'étape 9 ;
9. Effectuer un deuxième traitement de sonication mais cette fois avec la suspension sans le stigmate ;
10. Bien rincer la sonde du sonicateur (éteint) avec un jet fort de saline dans le tube qui a servi à l'égoutter ;
11. Nettoyer la sonde pour le stigmate suivant en la plaçant environ 15 secondes au bac à ultrasons BRANSON 1510 réglé en mode sonication ;
12. Verser le contenu des deux tubes KIMBLE sur ou trois disques différents afin de ne pas surcharger les filtres en pollen et permettre ensuite un bon dénombrement des grains de pollen au scanner (verser environ 1/3 du tube principal sur chaque filtre, et vider tout le tube des eaux de rinçage sur le dernier filtre) ;
13. Si un deuxième traitement de sonication du stigmate a été nécessaire, vérifier sous la loupe binoculaire qu'il ne reste plus de pollen sur le stigmate et verser le contenu du tube sur un quatrième filtre ;
14. Pour chaque filtre, déposer une goutte de solution de glycérol sur une lame de microscope puis poser le filtre dessus ;

Annexe 4. Protocole d'analyse des stigmates de melon n'ayant reçu qu'une seule visite d'abeille

Ingrid Boucaud – Juillet 2008

Consommables

- Saline à 1% poids/vol. filtrée à 30 µm.
Peser 20 g de chlorure de sodium dans une fiole jaugée de 2 L, puis remplir la fiole d'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Placer la fiole sur une plaque avec un barreau d'agitation jusqu'à obtenir une solution limpide, c'est-à-dire jusqu'à ce que l'intégralité du sel soit dissout. Filtrer la solution sur un dispositif de filtration sous vide avec un filtre de 30 µm de vide de maille ;
- Solution de vert de malachite 0,1% poids/poids filtrée à 10 µm pour éliminer les débris ;
- Toile filtrante NITEX 03-30/18 (vide de mailles de 30 µm) de SEFAR-FYLTIS ;
- Disque de toile filtrante découpé avec un poinçon de 22 mm sur une plaque de plexiglass ;
- Solution de glycérol à 50% vol./vol.

Fabrication d'une lame avec un « puit »

Casser, dans une lame, quatre rectangles qui serviront à faire le bord du puit. Pour cela, rayer la lame de microscope dans le sens de la largeur à l'aide d'une lime (utiliser une règle pour faire une rayure bien droite).

Poser ensuite cette lame sur une autre en faisant dépasser le morceau à casser. Détacher ce dernier avec une simple pression du doigt.

Après avoir obtenu quatre rectangles de verres, les disposer sur une autre lame afin de former un puit, puis les coller (colle multifonction ou universelle, en gel).

Mode opératoire

1. Préparation des stigmates

15. Préparer une solution d'eau saline colorée : Verser 10 mL de solution saline à 1% avec la dispensette III Organic et ajouter 10 µL de solution de vert de malachite (utiliser le PIPETMAN P20 de 10 µl) dans un tube en verre borosilicaté de 15 mL (modèle 60965 – <http://208.72.236.210/html/pg-60965.html> ; KIMBLE, Vineland, NJ) ;
16. Homogénéiser la solution saline colorée en l'agitant légèrement en tournant ou en plaçant le tube KIMBLE contenant la solution dans le bac à ultrason BRANSON 1510 réglé en mode sonication pendant environ 10 secondes ;

17. Utiliser le Pipetman P1000 pour remplir grossièrement avec environ 1,2 ml de la solution ainsi préparée chaque tube Eppendorf contenant un stigmate sec à analyser (préparer à nouveau de la solution saline colorée si nécessaire en répétant les étapes 1 et 2), ajuster à la graduation 1,5 mL des tubes Eppendorf ;
18. Vérifier la bonne étanchéité des tubes Eppendorf, puis les placer dans la rôtissoire
Démarrer le chronomètre afin de pouvoir noter ultérieurement la durée de trempage des stigmates ;
Laisser tremper les stigmates pendant une vingtaine d'heures à température ambiante ;

2. Observation des lobes

19. Avant de commencer l'analyse des stigmates, noter la durée pendant laquelle ils ont trempé ;
20. Placer un disque de filtre sur le support en verre fritté du système de filtration.
21. Verser le contenu du tube Eppendorf dans un tube KIMBLE de 15ml. Récupérer le stigmate à l'aide d'une pince et le rincer au-dessus du filtre à l'aide d'une pissette à bec fin contenant de la saline ;
22. Déposer le stigmate, ouvert avec les lobes bien étalés et le style au-dessus, sur une lame avec un « puit » ;
Rincer la pince utilisée ainsi que le tube Eppendorf vide, au-dessus du filtre ;
Déposer une goutte de saline sur le stigmate, puis une lame de microscope sur l'ensemble ;
23. Observer les deux faces du stigmate à la loupe binoculaire et noter le nombre de lobes du stigmate, ainsi que le nombre de lobes avec du pollen ;

3. Sonication des stigmates et filtration

24. Remettre le stigmate dans le tube KIMBLE ;
Rincer les lames et les pinces utilisées au-dessus du filtre ;
25. Ajouter 10 mL de Solution saline (Dispensette III Organic) puis 20 μ L de Vert de Malachite dans le tube KIMBLE contenant le stigmate ;
Rincer la pince et le tube Eppendorf au-dessus du filtre ;
26. Effectuer un premier traitement avec la sonde à ultrasons (SONICATOR W385 ; Misonix, New-York, USA) { bas de la sonde à 5 mm du fond du tube ; amplitude = 72 μ m ; durée 60 s}. S'assurer avant le traitement que l'extrémité de la sonde présente une surface brillante, sinon la passer au papier de verre. Après cette première sonication, retirer le tube et le remplacer par un tube vide pour permettre à la sonde de s'égoutter, ce tube servant ensuite à récupérer les eaux de rinçage de la sonde (voir étape 15) ;
27. Le stigmate peut être explosé ou en morceaux, si c'est le cas, le noter sur le cahier de laboratoire ;
Si le stigmate a explosé, passer directement à l'étape 16 ;
28. Retirer le stigmate du tube où il se trouve puis le rincer au-dessus du filtre et le placer entre deux lames. Bien presser les lames pour écraser le stigmate et vérifier sous la loupe binoculaire qu'il n'y ait plus de grains de pollen dessus (grossissement x25 ou x50).

S'il reste du pollen, réaliser un comptage visuel ;

29. Effectuer un deuxième traitement de sonication, comme à l'étape 12, mais cette fois avec la suspension sans le stigmate ;
30. Bien rincer la sonde du sonicateur (éteint) avec un jet fort de saline dans le tube qui a servi à l'égoutter ;
31. Nettoyer la sonde pour le stigmate suivant en la plaçant environ 15 secondes au bac à ultrasons BRANSON 1510 réglé en mode sonication ;
32. Verser le contenu des deux tubes KIMBLE sur le filtre en les rinçant avec la pissette d'eau saline. Bien rincer le système de filtration ;
33. Placer ensuite le filtre sur un support présentant des lignes parallèles afin de faciliter le comptage. Mettre l'ensemble sous la loupe binoculaire et effectuer un comptage visuel ;

Annexe 5. Protocole de comptage des grains de pollen : Utilisation du logiciel d'imagerie ImageJ 1.36b

Protocole élaboré par Nicolas MORISON, Gabriel CARRE, & Stéphanie PETITCUNOT en 2006 et mis à jour par Fabien BALAGUER et Damien FAU en 2007.

1- Numérisation d'une lame

- Mettre en marche le scanner (attente d'environ 1 minute) ;
- Placer les lames avec leur filtres sur les supports de lecture du scanner et engager le support dans le rail du scanner ;
- Ouvrir le logiciel NIKON SCAN 4 et choisir la position de la lame à numériser dans l'onglet gris en haut à gauche de l'écran ; cliquer dessus pour la sélectionner ;
- Scanner la lame avec le scanner COOLSCAN 9000 ED (NIKON ; http://imaging.nikon.com/products/imaging/lineup/scanner/scoolscan_9000/) ;
- Cliquer sur 'Aperçu' (bouton bleu) en bas à gauche pour voir l'ensemble de la lame ;
- Sélectionner sur la lame la zone appropriée pour compter tous les grains de pollen sur le filtre et cliquer sur '+' (bouton vert à droite du bouton 'aperçu') pour réaliser un agrandissement de la zone et être certain de ne pas manquer de grains. Appuyer sur le bouton 'mise au point automatique' (à côté du bouton '+') pour rendre la zone choisie plus nette. Attention à ce que cette image ne soit pas trop grosse (< 16 Mo sur le iMac) ;
- Enregistrer l'image scannée sur le disque dur au format .tif en indiquant les références du stigmate dans le nom du fichier ;

2- Comptage du nombre de grains de pollen :

- Ouvrir l'image en la faisant glisser sur l'icône du logiciel d'analyse d'images IMAGEJ 1.36B (<http://rsbweb.nih.gov/ij/features.html>) ;
- Suivre le protocole suivant pour sélectionner la couleur qui correspond aux grains de pollen et éliminer le fond d'image correspondant au filtre :
« Plugins » => « Jars » => « Threshold colour » : réglage de la courbe « hue » sur 110-200 puis fermer la fenêtre ;
- Binariser l'image :
« Image » => « Type » => « 8-bit » ;
- Eliminer les images parasites :
« Image » => « Adjust » => « Threshold » : décaler la bordure gauche pour atteindre le début du spectre et régler la borne droite de façon à ne garder que le ou les pics correspondant aux grains de pollen (ce qui est sélectionné apparaît en rouge sur l'image). Noter pour chaque filtre la valeur de ces bornes sur le cahier de laboratoire => « Apply » => « ok »
- Conserver uniquement les images dont la taille correspond à celle des grains de pollen de melon :

Annexe 6. Protocole de comptage des grains de pollen des pelotes de melon: Utilisation du logiciel d'imagerie ImageJ 1.36b

Smooth method = none.

Adapté en août 2008 par Ingrid BOUCAUD pour le comptage du pollen des pelotes à partir du protocole élaboré par Nicolas MORISON, Gabriel CARRE, & Stéphanie PETITCUNOT en 2006 et mis à jour par Fabien BALAGUER et Damien FAU en 2007.

1- Numérisation d'une lame

- Mettre en marche le scanner (attente d'environ 1 minute) ;
- Placer les lames avec leur filtres sur les supports de lecture du scanner et engager le support dans le rail du scanner ;
- Ouvrir le logiciel NIKON SCAN 4 et choisir la position de la lame à numériser dans l'onglet gris en haut à gauche de l'écran ; cliquer dessus pour la sélectionner ;
- Scanner la lame avec le scanner COOLSCAN 9000 ED (NIKON ; http://imaging.nikon.com/products/imaging/lineup/scanner/scoolscan_9000/) ;
- Cliquer sur 'Aperçu' (bouton bleu) en bas à gauche pour voir l'ensemble de la lame ;
- Sélectionner sur la lame la zone appropriée pour compter tous les grains de pollen sur le filtre et cliquer sur '+' (bouton vert à droite du bouton 'aperçu') pour réaliser un agrandissement de la zone et être certain de ne pas manquer de grains. Appuyer sur le bouton 'mise au point automatique' (à côté du bouton '+') pour rendre la zone choisie plus nette. Attention à ce que cette image ne soit pas trop grosse (< 16 Mo sur le iMac) ;
- Enregistrer l'image scannée sur le disque dur au format .tif en indiquant les références du stigmaté dans le nom du fichier ;

2- Comptage du nombre de grains de pollen :

- Ouvrir l'image en la faisant glisser sur l'icône du logiciel d'analyse d'images IMAGEJ 1.36B (<http://rsbweb.nih.gov/ij/features.html>) ;
- Suivre le protocole suivant pour sélectionner la couleur qui correspond aux grains de pollen et éliminer le fond d'image correspondant au filtre :
 - « Plugins » => « Jars » => « Threshold colour » : réglage de la courbe « hue » sur 40-145 et de la courbe « Brightness » sur 0-225 puis fermer la fenêtre ;
- Binariser l'image :
 - « Image » => « Type » => « 8-bit » ;
- Eliminer les images parasites :
 - « Image » => « Adjust » => « Threshold » : décaler la bordure gauche pour atteindre le début du spectre et régler la borne droite de façon à ne garder que le ou les pics correspondant aux grains de pollen (ce qui est sélectionné apparaît en rouge sur l'image). Noter pour chaque filtre la valeur de ces bornes sur le cahier de laboratoire => « Apply » => « ok »
- Conserver uniquement les images dont la taille correspond à celle des grains de pollen de melon :

Annexe 7. Protocole pour déterminer l'effectif de grains de pollen des pelotes de pollen de melon

Ingrid BOUCAUD - Août 2008

Consommables

- Saline à 1% poids/vol. filtrée à 30 μm .
Peser 20 g de chlorure de sodium dans une fiole jaugée de 2 L, puis remplir la fiole d'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Placer la fiole sur une plaque avec un barreau d'agitation jusqu'à obtenir une solution limpide, c'est-à-dire jusqu'à ce que l'intégralité du sel soit dissout. Filtrer la solution sur un dispositif de filtration sous vide avec un filtre de 30 μm de vide de maille ;
- Solution de vert de malachite 0,1% poids/poids filtrée à 10 μm pour éliminer les débris ;
- Toile filtrante NITEX 03-30/18 (vide de mailles de 30 μm) de SEFAR-FYLTIS ;
- Disque de toile filtrante découpé avec un poinçon de 22 mm sur une plaque de plexiglass ;
- Solution de glycérol à 50% vol./vol.

Mode opératoire

1. Mesure du poids de la pelote sèche

Peser la patte avec la pelote dans une cupule de pesée à l'aide d'une balance de précision. Sous une loupe binoculaire, détacher la pelote à l'aide d'une pince fine (en plaquant la patte avec un doigt), et placer la pelote dans un tube en verre borosilicaté de 15 mL (modèle 60965 – <http://208.72.236.210/html/pg-60965.html> ; KIMBLE, Vineland, NJ). Rincer la pince au dessus du tube sans laisser couler trop de saline (pour éviter que le tube ne déborde par la suite).

Peser la patte sans la pelote et en déduire le poids de la pelote sèche.

2. Préparation des filtres de pollen pour le comptage

1. Dans le tube KIMBLE contenant la pelote, ajouter 12 mL de saline (Dispensette III Organic), puis 100 μL de solution de vert de malachite.
2. Effectuer un traitement avec la sonde à ultrasons (SONICATOR W385 ; Misonix, New-York, USA) { hauteur de l'extrémité de la sonde sous la surface du liquide = 1 mm ; amplitude = 36 μm ; durée 60 s}. S'assurer avant le traitement que l'extrémité de la sonde présente une surface brillante, sinon la passer au papier de verre.
3. Retirer le tube et le remplacer par un tube vide pour permettre à la sonde de s'égoutter.

4. Bien rincer la sonde du sonicateur (éteint) avec un jet fort de saline dans le tube qui a servi à l'égoutter.
5. Placer un disque de toile filtrante sur le support en verre fritté du système de filtration et agiter le tube contenant le pollen (ou le passer au bac à ultrasons BRANSON 1510 réglé en mode set sonic, pendant 10 s) afin d'homogénéiser la suspension.
6. Verser une fraction du contenu du tube sur le filtre (le nombre de fractions, et donc de filtres, dépend du poids de la pelote avec comme objectif de ne pas avoir plus de 6000 grains de pollen par filtre : Deux sont suffisants lorsque la pelote pèse moins de 0,20 mg, mais il en faut 4 pour une pelote entre 0,2 et 1,0 mg et 6 ou plus si le poids de la pelote est supérieur à 1 mg). Pour partager plus facilement le contenu du tube en 6, répartir le liquide entre deux tubes KIMBLE et ajouter dans chacun 12 mL de saline, puis verser le contenu de chaque tube sur 3 filtres).
7. Déposer une goutte de solution de glycérol sur une lame de microscope, puis poser le filtre dessus.
8. Répéter cette opération pour chaque filtre. Sur le dernier, bien rincer le tube vide avec une pissette de saline, puis ajouter les eaux de rinçage de la sonde en rinçant le tube.
9. Après avoir mis un nouveau filtre sur le support en verre fritté, mettre la patte dans un tube KIMBLE avec 12 mL de saline et 100 μ L de vert de malachite. Effectuer un traitement de sonication comme à l'étape 2.
10. Récupérer le tube contenant la patte postérieure d'abeille et le remplacer par le tube vide dans lequel la sonde va s'égoutter.
11. Récupérer la patte à l'aide d'une pince fine, la rincer au-dessus du filtre avec une pissette de saline, et l'examiner sous une loupe binoculaire pour s'assurer qu'elle est bien indemne de pollen. Rincer la pince au-dessus du filtre.
12. Versez le contenu du tube sur le filtre en le rinçant avec de la saline.
13. Rincer la sonde du sonicateur dans le tube qui a servi à l'égoutter et verser le contenu du tube sur le filtre.
14. Nettoyer la sonde pour la sonication suivante en la plaçant environ 15 secondes au bac à ultrasons.
15. Déposer une goutte de solution de glycérol sur une lame de microscope, puis poser le filtre dessus.

Résumé

La pollinisation des cultures entomophiles sous abris clos nécessite l'introduction d'insectes pollinisateurs. L'abeille domestique peut bien s'adapter à ces milieux et elle est de plus en plus utilisée. Mais sous abris le pollen se trouve souvent en quantité limitée et les abeilles en récoltent pour alimenter leur colonie. L'impact de cette récolte peut être considérable puisque nous avons trouvé qu'un milligramme de pelote sèche récoltée dans un tunnel fermé de melon contenait en moyenne 21400 grains de pollen de cette espèce. Autrement dit, une charge même très modeste de 3 mg de pelotes sèches représenterait la disponibilité totale en pollen de 7 fleurs staminées. Nous avons donc testé l'hypothèse que le nourrissage au pollen des colonies qui permet de réduire cette récolte de pollen pourrait aussi se traduire par une augmentation de leur activité pollinisatrice. Pour cela, deux colonies d'environ 6300 abeilles ont été installées à des dates différentes, chacune dans un tunnel de 22 m de long sur 8 m de large conduit en 'abeilleproof' et contenant une culture de melon monoïque en fleurs. Huit jours après leur mise en place, les colonies ont été nourries le soir avec 1,2 kg de pollen. Dès le lendemain et pendant les 4 jours consécutifs de relevés qui ont suivi ce nourrissage, ce traitement a eu pour effet (i) de diminuer de plus de moitié le nombre de butineuses de pollen, (ii) de multiplier par quatre l'efficacité pollinisatrice individuelle des butineuses en termes de quantité de pollen déposée sur les stigmates après une seule visite et plus encore en termes de fructification, et (iii) de multiplier par deux l'activité pollinisatrice des colonies évaluée comme la charge en pollen des stigmates des fleurs en pollinisation libre. Le nourrissage au pollen des colonies pour la pollinisation des cultures sous abris clos présente donc un intérêt potentiel considérable pour améliorer la pollinisation chaque fois qu'il y a des risques de manque de pollen, en particulier pour la production de semences hybrides. L'impact d'un tel traitement sur les colonies et sur leur activité pollinisatrice en plein air reste cependant à déterminer.

Abstract

The pollination of entomophilous crops under insectproof enclosures requires the introduction of pollinating insects. Honey bee colonies can adapt well to such confined environments and they are now used extensively. But pollen is often a limited resource under enclosures and bees collect it to feed their colonies. The impact of their pollen harvest can be considerable as our results indicate that one mg of dry pollen pellet foraged in a greenhouse planted only with cantaloupe contained on average 21400 pollen grains of this species. That is even a modest load of 3 mg of dry pellets would represent the total amount of pollen available in 7 staminate flowers. We therefore tested the hypothesis that the pollen feeding of colonies which reportedly reduces their pollen harvest may also lead to an increase in the pollinating activity of a colony. To do so, two colonies of ca. 6300 bees were installed each on a separate date in a beeproof 22-m long by 8-m wide plastic greenhouse planted with monoecious cantaloupe. Eight days after their introduction, the colonies were fed 1.2 kg of pollen. The very next day and over the consecutive 4 days during which we monitored the situation afterwards, this feeding (i) reduced the density of pollen foragers by more than half, (ii) multiplied by four the pollination effectiveness of individual foragers measured as the stigmatic pollen loads after a single visit and even more so when based on the fruit set of these flowers, and (iii) doubled the pollinating activity of the colonies (stigmatic pollen loads from open-pollinated flowers). Pollen feeding of colonies used for pollination in enclosure thus offers great potential to improve pollination whenever there is a risk of pollen shortage, especially for the production of hybrid seeds. Yet the effect of such a treatment on the colonies and on their pollinating activity in the open remains to be studied.