

Biologie de la reproduction du châtaignier et conception des vergers

Clément Larue et Rémy Petit

Introduction

La production de fruits dépend des services de pollinisation ¹. Chez les espèces pollinisées par les insectes, deux services doivent être pris en compte : le transport du pollen par les insectes pollinisateurs et la production de pollen par des arbres compatibles. S'il n'y a pas assez d'insectes pollinisateurs ou de plantes productrices de pollen, le service de pollinisation, et donc la production de fruits, seront réduits. Chez le châtaignier, les résultats obtenus ces dernières années remettent en question la conception traditionnelle des vergers. Contrairement à ce que l'on pensait autrefois, le châtaignier n'est pas pollinisé par le vent mais par des insectes sauvages ^{2,3}. De plus, le châtaignier est auto-incompatible ^{4,5}, les fleurs femelles d'un arbre donné doivent donc être fécondées par le pollen produit par un arbre différent (appartenant à une autre variété) pour former un fruit. Par conséquent, les vergers doivent comprendre suffisamment de cultivars compatibles pour assurer le service de pollinisation ⁶.

Les premières discussions sur la répartition spatiale des arbres dans les vergers de châtaigniers sont assez anciennes : les avantages relatifs de la plantation en carré ou en quinconce ont été discutés dès le début du 20^{ème} siècle ⁷. Afin d'optimiser la production des vergers, des expériences de compatibilité entre cultivars impliquant des applications manuelles de pollen ont été effectuées très tôt ⁸. Cependant, ces expériences sont longues et délicates à mettre en œuvre, car le pollen utilisé doit être viable et vierge de contamination. De plus, sans recourir à des analyses génétiques, il n'est pas possible d'identifier avec certitude les cultivars produisant le pollen responsable de la production de fruits. Avec le développement des marqueurs moléculaires, les analyses de paternité sont devenues de plus en plus populaires pour étudier les échanges de pollen entre les arbres ⁹. Par exemple, chez le châtaignier, la distance entre les arbres mères et les arbres donneurs de pollen a un effet majeur sur la production de fruits ¹⁰. Mais il est possible d'aller encore plus loin en couplant à des recherches de paternité des mesures du succès de la pollinisation ¹¹⁻¹³.

À la fin du printemps, les châtaigniers sont couverts de fleurs mâles blanches à jaunâtres qui dégagent une forte odeur de sperme ². La floraison est massive et synchrone. Bien que l'autopollinisation soit élevée, l'autofécondation reste limitée en raison des barrières contre l'autofécondation ⁵. Des estimations publiées précédemment ¹⁴ montrent que 90% du pollen reçu par les fleurs femelles est de l'autopollen alors que moins de 1% des fruits produits sont issus d'autofécondation. Quelles sont les conséquences de cette forte autopollinisation sur la production de fruits ?

Trop peu d'arbres producteurs de pollen

Dans le sud-ouest de la France, les vergers de châtaigniers ont été simplifiés au maximum. Très peu de cultivars sont généralement utilisés. Les vergers de châtaigniers sont souvent entourés de forêts de châtaigniers, et le mythe qu'il n'est pas nécessaire d'avoir une grande diversité dans les vergers car les châtaigniers sauvages garantissent une pollinisation suffisante persiste. Afin de réévaluer l'importance de la diversité des vergers pour la production de fruits, nous avons étudié cinq vergers de châtaigniers en Dordogne caractérisés par des productions très variables et réalisé des diagnostics pollinisation complets basés sur des estimations du taux de remplissage des bogues et des analyses de paternité ⁹.

Dans chaque verger, nous avons mesuré le taux de remplissage sur chaque arbre mère étudié (un indicateur fiable du succès de la pollinisation, voir [Connaissances du châtaignier #2](#)). Cela nous a permis de calculer le pourcentage de fruits fécondés par les cultivars plantés dans les vergers. Nous l'avons comparé au pourcentage de fruits fécondés par des châtaigniers situés à l'extérieur des vergers (arbres forestiers, champêtres ou d'autres vergers). Nous montrons que le nombre et la diversité des arbres pollinisateurs au sein du verger déterminent dans une large mesure les taux de fécondation des fleurs femelles et donc la production de fruits. Ces résultats s'expliquent car la dispersion du pollen de châtaignier est généralement limitée, les insectes pollinisateurs sauvages du châtaignier (voir [Connaissances du châtaignier #3](#)) se déplaçant sur de courtes distances. De plus,

les forêts de châtaigniers voisines sont constituées de châtaigniers européens qui ne peuvent jouer qu'un rôle mineur dans la fertilisation des cultivars hybrides en raison de barrières interspécifiques assez fortes ^{9,13}.

Par exemple, nos résultats montrent que pour le cultivar 'Marigoule', un cultivar hybride mâle-fertile, le taux de remplissage est multiplié par cinq entre un verger monovariétal produisant en moyenne un fruit toutes les trois bogues et un verger diversifié avec plusieurs cultivars pollinisateurs dans lequel le taux de remplissage atteint jusqu'à deux fruits par bogue ⁹. C'est aussi le cas pour les cultivars mâle-stériles où la diversité du verger a un fort impact positif sur le taux de remplissage ⁹.

Les pollinisateurs du châtaignier sont des insectes modérément mobiles tels que les mouches à calyptres ou les coléoptères, et non les abeilles sauvages ou domestiques, plus mobiles ^{2,15}. En conséquence, les arbres producteurs de pollen ne doivent pas être situés trop loin des arbres à polliniser, ce qui implique qu'ils soient répartis uniformément dans le verger. Par exemple, dans un verger de châtaigniers avec plusieurs rangées consécutives du même cultivar, des chercheurs japonais ont montré que le rendement en fruits chute rapidement à mesure que la distance à la rangée d'arbres donneurs de pollen augmente ¹⁰. Le taux de remplissage était de 66% pour la rangée adjacente aux arbres producteurs de pollen, et de 42%, 34% et 25% pour les rangées 2, 3 et 4. En d'autres termes, la probabilité de fécondation est presque divisée par trois quand les arbres producteurs de pollen sont situés à seulement 16 m des arbres à polliniser. La diversité des cultivars plantés dans les vergers et leur répartition spatiale sont donc cruciales pour le succès de la pollinisation, car c'est la seule garantie d'une production fruitière élevée et régulière. Une fois le verger établi, l'amélioration de la composition du verger est fastidieuse et incertaine : cela implique l'élimination d'un sous-ensemble d'arbres ou leur surgreffage avec d'autres cultivars. Il est donc important de réfléchir à la composition des vergers avant la plantation pour concevoir les meilleurs vergers possibles garantissant un succès maximal de la pollinisation. Cela implique non seulement une grande diversité génétique dans les vergers et une disposition spatiale régulière, mais aussi la sélection de cultivars qui atteindront une fructification maximale dans ces conditions. Pour sélectionner de tels cultivars, nous devons examiner attentivement la biologie de la reproduction du châtaignier.

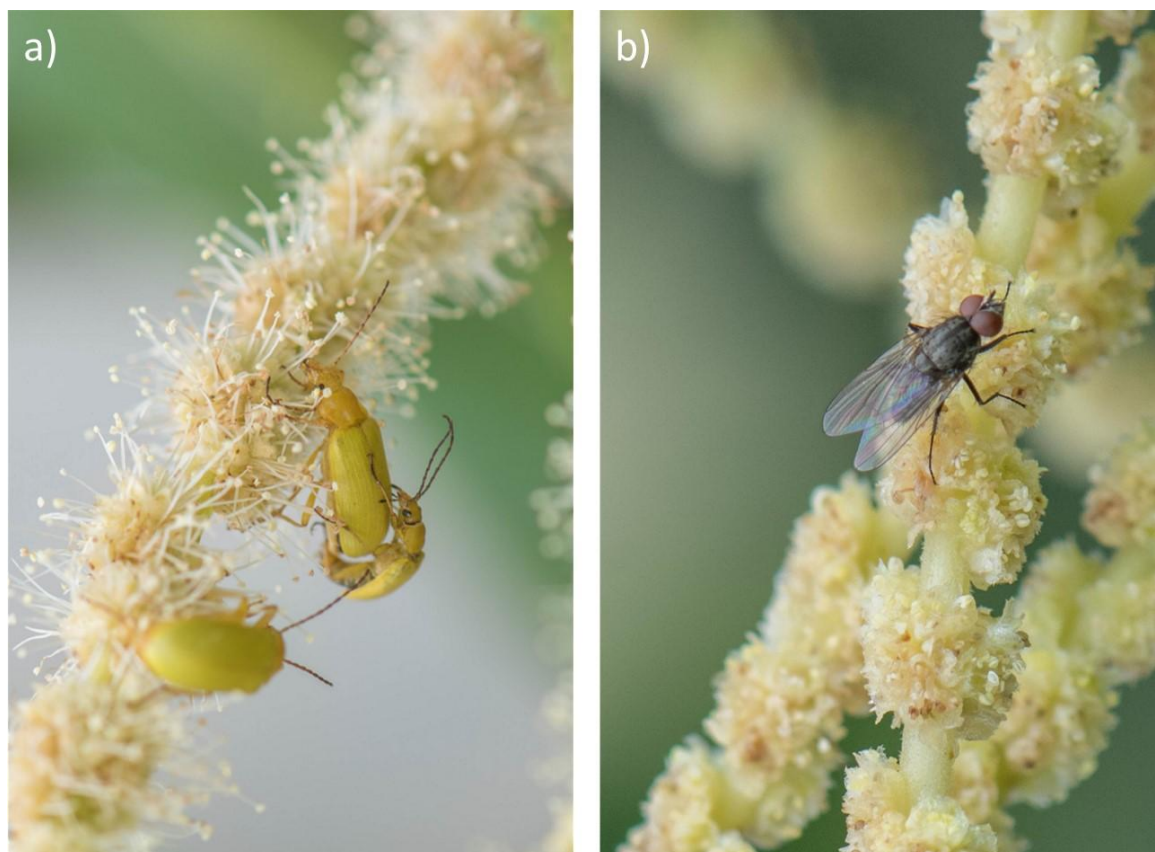


Figure 1 : Photos en gros plan de chatons mâles de châtaigniers. A) Arbres mâle-fertiles en pleine floraison. Les nombreuses étamines portent de minuscules anthères situées à l'extrémité de longs filaments. Ces arbres produisent massivement du pollen. B) Arbres mâle-stériles en pleine floraison. Les étamines ont avorté et ne produisent pas de pollen.

Une capacité à produire du pollen variable

La fertilité mâle, c'est-à-dire la capacité à produire du pollen, varie considérablement d'un cultivar à l'autre, de sorte que tous les cultivars n'ont pas la même capacité à fertiliser les arbres environnants ¹³. En fait, deux types d'arbres peuvent être facilement distingués : les arbres cosexués, qui sont mâle-fertiles, et les arbres femelles, qui sont complètement ou en grande partie mâle-stériles ^{8,13} (**Figure 1**). Les arbres mâle-fertiles, qui produisent de grandes quantités de pollen, sont appelés arbres "longistaminés" dans la littérature, tandis que les arbres mâle-stériles sont subdivisés en trois catégories : arbres "astaminés", "brachystaminés" et "mésostaminés" ^{8,16}. Il est intéressant de noter que même s'ils ne produisent pas ou plus de pollen, les chatons des arbres mâle-stériles continuent de produire du nectar et d'attirer les pollinisateurs, assurant ainsi une pollinisation efficace ².

Les arbres mâle-stériles sont fréquents chez les châtaigniers européens ou dans les hybrides interspécifiques lorsque la mère est un châtaignier européen ¹⁷. Cette variation de la fécondité des mâles a également été détectée dans les forêts naturelles de châtaigniers, ce qui fait du châtaignier européen l'une des rares espèces d'arbres gynodioïques ¹⁸.

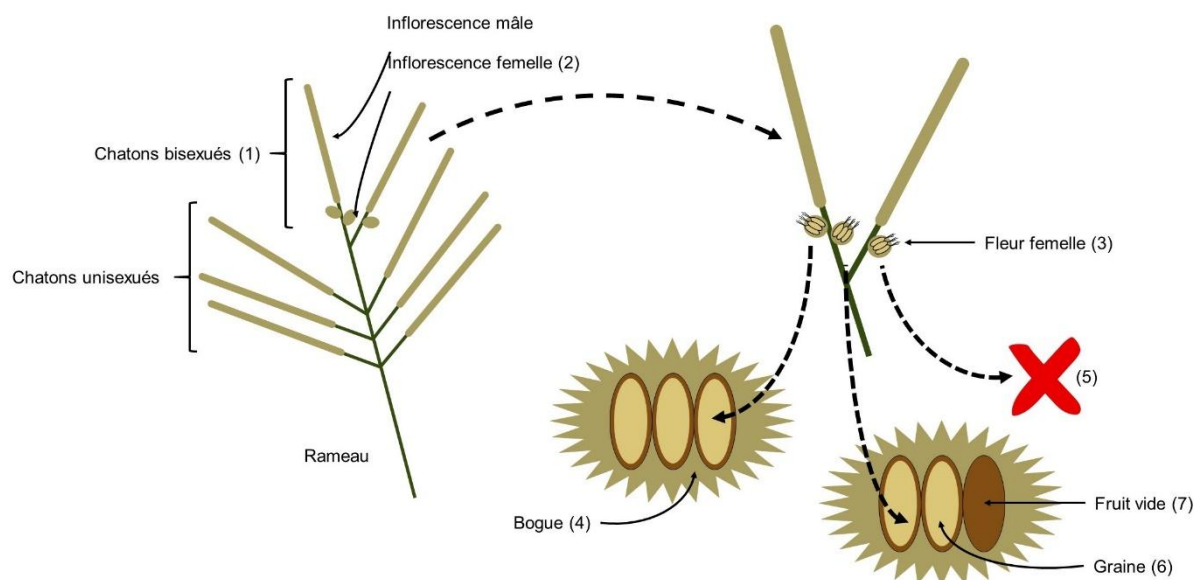


Figure 2 : Devenir des fleurs femelles. 1) Chaque chaton bisexué peut avoir une ou deux inflorescences femelles. 2) Chaque inflorescence femelle est composée de trois fleurs femelles positionnées côte à côte. 3) Chaque fleur femelle devient une châtaigne. 4) L'inflorescence femelle devient une infructescence : les bractées florales forment la bogue qui contient trois fruits. 5) Chaque bogue avorte. 6) Si une fleur femelle est pollinisée, elle forme un fruit rempli contenant une graine. 7) Si la fleur femelle n'est pas pollinisée, le fruit formé est vide.

L'avantage femelle

Chez le châtaignier, les fleurs femelles sont regroupées par trois pour former de petites inflorescences femelles qui deviendront plus tard des bogues épineuses contenant les châtaignes. À quelques exceptions près, les bogues contiennent trois fruits. Si une fleur femelle est fécondée, elle produit un fruit rempli comprenant généralement une seule graine. En l'absence de fécondation, elle produit un fruit vide : le péricarpe d'origine maternelle se développe, mais il ne contient aucune graine à l'intérieur. La mesure du taux de remplissage (voir **Connaissances du châtaignier #2**) permet une estimation fiable de la qualité du service de pollinisation, à condition de prendre en compte les bogues qui avortent au cours de l'été ^{13,18} (**Figure 2**).

Pour estimer l'avantage femelle des arbres mâle-stériles, nous avons utilisé la collection de châtaigniers INRAE située à Villenave d'Ornon ¹⁹. Cette collection est constituée de 242 arbres correspondant à 92 génotypes différents appartenant aux différentes espèces de châtaigniers et

leurs hybrides interspécifiques. En 2018 et 2019, nous avons estimé les taux de remplissage sur tous les arbres de la collection qui avaient fructifié : 176 arbres en 2018 (110 mâle-fertiles et 66 mâle-stériles) et 206 arbres en 2019 (134 mâle-fertiles et 72 mâle-stérile). En 2018, le taux de remplissage moyen des arbres cosexués était de 61% et celui des arbres femelles de 82%. En 2019, le taux de remplissage moyen des arbres cosexués était de 55% et celui des arbres femelles de 83%. Les arbres mâle-stériles ont donc un meilleur taux de remplissage que les arbres mâle-fertiles.

Nous avons continué ces mesures de taux de remplissage tous les ans sur un sous-ensemble des arbres de la collection de châtaignier INRAE (Figure 3). Le taux de remplissage des arbres mâle-stériles est toujours plus élevé que celui des arbres mâles-fertiles, et certaines années, il est deux fois plus élevé. Ce taux de remplissage est assez stable chez les arbres mâle-stériles mais varie fortement au cours des ans chez les arbres mâles fertiles. Nous avons étudié d'autres caractéristiques des châtaigniers, comme le nombre d'inflorescences mâles et femelles, la croissance ou la survie des arbres, mais nous n'avons pas identifié d'autres différences significatives entre les arbres mâle-fertile et les arbres mâle-stériles.

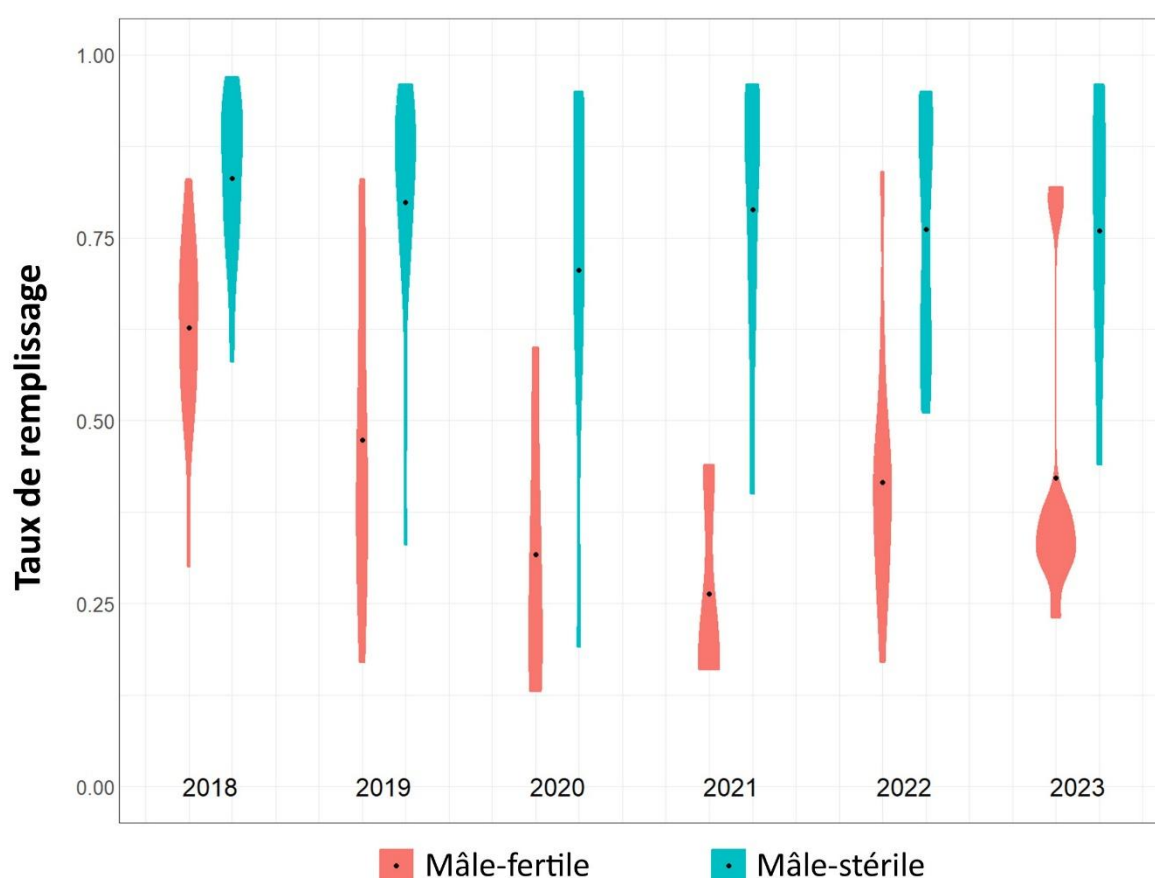


Figure 3 : Taux de remplissage d'arbres mâle-fertiles (en rouge) et mâle-stériles (en bleu) mesurés aux cours des six dernières années dans le verger conservatoire INRAE. Les arbres mâle-fertiles ont un meilleur taux de remplissage que les arbres mâles fertiles. Ce taux varie peu entre années chez les arbres mâle-fertiles mais beaucoup plus chez les arbres mâles-fertiles.

L'interférence avec l'autopollen

Nous attribuons cet avantage des arbres femelles (un taux élevé de remplissage des bogues) au fait que ces arbres sont libérés de l'interférence négative entre sexes. Cette interférence sexuelle peut conduire à une perte de gamètes femelles et à une réduction de la production de graines, même chez les espèces auto-incompatibles²⁰. Dans raisons à cette interférence sont généralement citées. Premièrement, l'autopollen peut obstruer les stigmates, en occupant l'espace disponible, réduisant ainsi les chances que des grains de pollen compatibles s'établissent sur les stigmates et y germent. Deuxièmement, l'autopollen peut germer et les tubes polliniques peuvent pénétrer dans les ovules,

puis les faire avorter : il en résulte un gaspillage d'ovules, c'est-à-dire qu'à la suite d'interactions avec l'autopollen, les ovules rendus non fonctionnels ne sont plus disponibles pour être fécondés par un grain de pollen compatible ^{21,22}. C'est ce deuxième mécanisme qui semble jouer chez le châtaignier.

Pour estimer cette interférence causée par l'autopollen, nous avons développé un modèle statistique bayésien ¹³ basé sur des analyses de paternité et des mesures de taux de remplissage. Nous avons géolocalisé, géotypé et phénotypé tous les châtaigniers de la collection INRAE, et sélectionné 43 arbres-mères sur lesquels nous avons récolté des fruits. Les résultats obtenus démontrent que l'interférence avec l'autopollen doit être prise en compte pour prédire avec précision le taux de remplissage des arbres. Grâce à ce modèle, la proportion d'autopollen reçue par chaque arbre mère peut être estimée à différents stades du cycle reproductif. Nous avons estimé que 74% pollen reçu par un arbre mère mâle-fertile est de l'autopollen. Toutefois, comme l'allopollen est plus compétitif que l'autopollen, seulement 48% des ovules sont fécondés par de l'autopollen. Ensuite, 95% des ovules autofécondés avortent pour différentes raisons, de telle sorte que seulement environ 5% des fruits des arbres mâle-fertiles sont autofécondés ¹³. L'interférence avec l'autopollen a donc un effet négatif majeur sur la formation des fruits, puisqu'elle aboutit au gaspillage de près de 46% des ovules d'un arbre mâle-fertile.

Implications pour la conception des vergers

Plusieurs enseignements peuvent d'ores et déjà être tirés de ces travaux pour la conception des vergers. L'autopollinisation entraîne une diminution inévitable du succès de la pollinisation. Cela signifie que les cultivars mâle-stériles doivent être privilégiés dans les nouveaux vergers grâce à leur meilleur taux de remplissage. Cependant, si seuls des cultivars mâle-stériles sont plantés dans un verger, peu de fruits seront produits, car ces cultivars produisent peu ou pas de pollen et ne se pollinisent donc pas mutuellement. En outre, le pollen produit par les arbres forestiers voisins ne fournira qu'une assurance à la pollinisation très limitée en raison de la faible capacité de dispersion du pollen et de l'existence de barrières reproductives lorsque des cultivars hybrides sont utilisés. D'autre part, si les nouveaux vergers sont composés d'un faible nombre de cultivars mâle-fertiles, leur autopollinisation entraînera un gaspillage important de fleurs femelles, limitant ainsi la production de fruits. Les vergers trop peu diversifiés, avec par exemple un seul cultivar mâle stérile producteur de fruits et un cultivar producteur de pollen, seront peu performants. Dans ces vergers ultra-simplifiés, la pollinisation du cultivar mâle-stérile peut être acceptable, mais sa stabilité à long terme n'est pas garantie car sa pollinisation dépend entièrement d'un seul cultivar émettant du pollen. En même temps, dans un tel verger simplifié, la pollinisation du cultivar mâle-fertile est catastrophique en raison de l'absence de donneurs de pollen compatibles. Idéalement, tous les arbres d'un verger devraient produire des fruits. Les cultivars mâle-stériles, en raison de leur fructification très élevée, devraient représenter la majorité des arbres, mais le verger doit également comprendre plusieurs cultivars mâle-fertiles pour garantir une pollinisation élevée de tous les arbres du verger.

Conclusion

Pour créer un verger bien pollinisé produisant des fruits abondamment, la diversité est la clé du succès. Ainsi, du pollen compatible atteindra la plupart des stigmates, malgré les fluctuations interannuelles de la floraison et la sensibilité inégale des cultivars à d'éventuelles épidémies et autres aléas. Les effets de l'autopollinisation ont longtemps été sous-estimés. Pourtant, ils ont des conséquences négatives importantes sur la formation de fruits. Les châtaigniers produisent du pollen en grande quantité et recouvrent leurs propres fleurs femelles d'autopollen. A cause de l'interférence de l'autopollen avec les ovules, de nombreuses fleurs femelles avortent et une grande partie des ovules sont gaspillés. Les arbres mâles-stériles évitent ce problème et bénéficient ainsi d'un succès de pollinisation beaucoup plus important. L'utilisation de variétés mâle-stériles devrait être encouragée dans les nouveaux vergers. Cependant, ils n'apportent pas de pollen au verger et ne peuvent donc pas être utilisés seuls : plusieurs cultivars mâle-fertiles doivent être inclus pour fournir une source de pollen fiable au sein du verger.

Références

- [1] Reilly JR, Artz DR, Biddinger D, Bobiwash K, Boyle NK, Brittain C, et al. Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators. *Proc R Soc B*. 2020;287(1931):20200922. doi:10.1098/rspb.2020.0922
- [2] Larue C, Austruy E, Basset G, Petit RJ. Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea* spp.): an integrated approach. *Botany Letters*. 2021;168(3):348-372. doi:10.1080/23818107.2021.1872041
- [3] Petit RJ, Larue C. Confirmation that chestnuts are insect-pollinated. *Botany Letters*. 2022;169(3):370-374. doi:10.1080/23818107.2022.2088612
- [4] Stout AB. Why are chestnuts self-fruitless? *Journal of the New York Botanical Garden*. 1926;27:154-158.
- [5] Xiong H, Zou F, Guo S, Yuan D, Niu G. Self-sterility may be due to prezygotic late-acting self-incompatibility and early-acting inbreeding depression in Chinese chestnut. *J Am Soc Hortic Sci*. 2019;144:172-181. doi:10.21273/JASHS04634-18
- [6] Breisch H. *Châtaignes et Marrons*. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes; 1995.
- [7] Laviolle JB. *Le Châtaignier*. Vigot Frères; 1906.
- [8] Solignat G, Chapa J. *La Biologie Florale Du Châtaignier*. Institut National de Vulgarisation pour les Fruits Légumes et Champignons; 1975.
- [9] Larue C, Petit RJ. Strong pollen limitation in genetically uniform hybrid chestnut orchards despite proximity to chestnut forests. *Annals of Forest Science*. 2023;80(1):37. doi:10.1186/s13595-023-01188-6
- [10] Nishio S, Takada N, Terakami S, Kato H, Inoue H, Takeuchi Y, et al. Estimation of effective pollen dispersal distance for cross-pollination in chestnut orchards by microsatellite-based paternity analyses. *Scientia Horticulturae*. 2019;250:89-93. doi:10.1016/j.scienta.2019.02.037
- [11] Klein E, Desassis N, Oddou-Muratorio S. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. IV. Whole interindividual variance of male fecundity estimated jointly with the dispersal kernel. *Mol Ecol*. 2008;17(14):3323-3336. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03809.x
- [12] Lagache L, Klein EK, Ducouso A, Petit RJ. Distinct male reproductive strategies in two closely related oak species. *Mol Ecol*. 2014;23(17):4331-4343. doi:10.1111/mec.12766
- [13] Larue C, Klein EK, Petit RJ. Sexual interference revealed by joint study of male and female pollination success in chestnut. *Molecular Ecology*. 2023;32(5):1211-1228. doi:10.1111/mec.16820
- [14] Hasegawa Y, Suyama Y, Seiwa K. Pollen donor composition during the early phases of reproduction revealed by DNA genotyping of pollen grains and seeds of *Castanea crenata*. *New Phytologist*. 2009;182(4):994-1002. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02806.x
- [15] Pauly G, Larue C, Petit RJ. Adaptive function of duodichogamy: Why do chestnut trees have two pollen emission peaks? *Am J Bot*. Published online 2023.
- [16] Bounous G, Paglietta R, Peano C. Methods for observing chestnut pollen viability, germinability and pollen tube growth. *Proceedings of the International Chestnut Conference, Morgantown, USA*. Published online 1992:76-78.

- [17] Soylu A. Heredity of male sterility in some chestnut cultivars (*Castanea sativa* mill.). *Acta Horticulturae*. 1992;(317):181-186. doi:10.17660/ActaHortic.1992.317.21
- [18] Larue C, Petit RJ. Harmful self-pollination drives gynodioecy in European chestnut, a self-incompatible tree. Published online March 4, 2023:2022.08.01.502348. doi:10.1101/2022.08.01.502348
- [19] Larue C, Barreneche T, Petit RJ. An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction. *Ann For Sci*. 2021;78(4):90. doi:10.1007/s13595-021-01104-w
- [20] de Jong TJ, Waser NM, Klinkhamer PG. Geitonogamy: The neglected side of selfing. *Trends Ecol Evol*. 1993;8(9):321-325. doi:10.1016/0169-5347(93)90239-L
- [21] Waser NM, Price MV. Reproductive costs of self-pollination in *Ipomopsis aggregata* (polemoniaceae): are ovules usurped? *Am J Bot*. 1991;78(8):1036-1043. doi:10.1002/j.1537-2197.1991.tb14511.x
- [22] Barrett SCH, Lloyd DG, Arroyo J. Styler polymorphisms and the evolution of heterostyly in *Narcissus* (Amaryllidaceae). In: *Floral Biology*. Springer US; 1996:339-376. doi:10.1007/978-1-4613-1165-2_13