

## Avancées récentes sur la pollinisation chez les orchidées méditerranéennes

Bertrand SCHATZ<sup>1</sup>, Roxane DELLE-VEDOVE<sup>1</sup>, Nicolas JUILLET<sup>1,2</sup> & Laurent DORMONT<sup>1</sup>

1) Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE), UMR CNRS 5175, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5

bertrand.schatz@cefe.cnrs.fr

2) Adresse actuelle : Conservatoire Botanique National de Corse, Office de l'Environnement de la Corse, avenue Jean Nicoli, 20250 Corte

**Abstract – Recent advances in pollination of Mediterranean orchids.** Orchids are fascinating because of the diversity in forms and colors on their inflorescences, which consequence of the large variety of strategies for pollinator attraction. Recent investigations in their pollination ecology are permitted by chemical ecology, by multidisciplinary approaches of this subject and by integration of questions raised from their conservation. We present three kinds of study during oral presentation, but we rather focus in one of them for this text. We detailed here the consequence of white morphs (hypochromy) in male orchis (*Orchis mascula*) on morphology, emitted scents, pollinator attraction and finally on the fruit set. All investigation of our team conducted hitherto showed that the understanding of the pollination ecology in mediterranean orchids enhances at different level thanks to a multidisciplinary approach and brings new and diverse informations relevant in conservation plans.

**Résumé –** Les orchidées sont fascinantes par la diversité des formes et des couleurs de leurs inflorescences, qui est la conséquence de la grande variété des stratégies d'attraction des pollinisateurs. Les avancées récentes en écologie de la pollinisation ont été marquées par le développement de l'écologie chimique, par l'approche pluridisciplinaire dans l'étude de la pollinisation et par l'intégration de ces problématiques dans des programmes de conservation. Plutôt que de présenter plusieurs études succinctement, nous avons préféré ici présenter une étude plus en détail. Il s'agit de l'étude concernant l'hypochromie florale étudiée ici chez l'orchis mâle au niveau de la morphologie, des odeurs émises, et de l'attraction des pollinisateurs, et des conséquences importantes de cette hypochromie sur le taux de pollinisation. L'ensemble des études menées jusqu'à présent par notre équipe montre que la compréhension de l'écologie de pollinisation des orchidées méditerranéennes progresse à différents niveaux notamment du fait de l'approche pluridisciplinaire, constituant ainsi de nouvelles informations pour améliorer les modalités de la conservation de ces espèces.

### INTRODUCTION

Les travaux récents de notre équipe ont permis des avancées significatives dans la connaissance de l'écologie de pollinisation de plusieurs espèces d'orchidées méditerranéennes. Lors du colloque SFO à Montpellier, nous avons présenté trois types de résultats : 1) Le premier concerne l'hybridation entre différentes espèces d'orchis qui a été étudiée de façon comparative entre les espèces parentales et l'hybride au niveau de la morphologie, des odeurs émises, du succès reproducteur, ce qui a permis de déterminer les causes et les conséquences de cette hybridation (Schatz, 2006). 2) Le deuxième porte sur l'ophrys d'Aymonin, endémique des Grands Causses, dont le taux de pollinisation est corrélé de façon non linéaire au nombre de fleurs, ce dernier facteur variant fortement sur l'ensemble de la zone de présence de cette espèce (Fleury *et al.*, 2008). 3) Le troisième correspond à l'étude de l'hypochromie florale étudié ici chez l'orchis mâle au niveau de la morphologie,

des odeurs émises, et de l'attraction des pollinisateurs avec des conséquences importantes sur le taux de pollinisation (Dormont *et al.*, 2010a, 2010b). Plutôt que de présenter ces études trop succinctement, nous avons préféré ici n'en présenter qu'une seule plus en détail, en l'occurrence celle sur l'hypochromie de l'orchis mâle.

L'écologie de la pollinisation a été marquée par le développement récent des techniques d'écologie chimique ainsi que par la tendance de plus en plus marquée d'analyse des résultats selon une approche pluridisciplinaire, parfois applicable à des programmes de conservation. Une récente revue de Raguso (2008) montre par exemple qu'au cours de l'année 2007, il y a eu environ 200 articles scientifiques concernant l'odeur florale, plus de 100 sur la couleur florale et 50 sur les odeurs végétatives, alors qu'en 1990 (et avant) le nombre d'articles sur chacun de ces domaines ne dépassait pas 20. Sa conclusion insiste sur l'importance qu'il y a à considérer les signaux olfactifs et visuels comme des caractères phénotypiques très importants dans l'expérience qu'un insecte acquiert lors de la visite d'une fleur.

La préférence des pollinisateurs pour certains caractères floraux peut avoir des conséquences sur le succès reproducteur des différents « morphotypes », et ainsi exercer une sélection sur ces caractères de l'espèce végétale qu'ils pollinisent et favoriser le maintien d'un polymorphisme floral (voir l'article de Roxane Delle-Vedove *et al.* dans ces Actes). Le polymorphisme phénotypique représente un système idéal d'étude de la sélection naturelle en conditions naturelles car il permet le suivi des changements génétiques des populations au travers de leur changement phénotypiques (Juillet, 2006). Dans ce contexte, un modèle particulier d'étude du polymorphisme floral correspond aux plantes trompeuses, qui n'offrent pas de récompense (nectar) (Salzmann *et al.*, 2007 ; Raguso, 2008 ; Dormont *et al.*, 2010a). Cette stratégie, rare chez la majorité des angiospermes, est particulièrement bien représentée chez les orchidées avec plus d'un tiers des espèces pratiquant la tromperie (revue dans Jersakova *et al.*, 2006 : voir l'article de Roxane Delle-Vedove *et al.* dans ces Actes). Chez ces espèces, les attendus théoriques sont d'une part un succès reproducteur faible puisque les capacités d'apprentissage des pollinisateurs leur permettent d'éviter ces fleurs après quelques essais (Neiland & Wilcock, 1998), et d'autre part une forte diversité florale permettant de compenser cette capacité d'apprentissage (Jersakova *et al.*, 2006).

Nous avons examiné ici le polymorphisme facultatif de couleur de type pourpre/ blanc, avec au sein des populations à inflorescence pourpre, de rares individus à inflorescence blanche chez l'orchis mâle (*Orchis mascula*). Nous avons examiné les questions suivantes chez cette espèce : (1) quelles sont les caractéristiques des deux formes de couleur (caractéristiques spectrales, odeur, morphologie, phénologie, localisation) (2) Existe-t-il des associations particulières entre ces différents caractères ? (3) Y a-t-il des différences de succès reproducteur entre ces différentes formes ?

## MATERIEL ET METHODES

### Site et matériel biologique

Plusieurs populations d'orchis mâles ont été étudiées dans la région dite des Grands Causses (sud du Massif Central) qui sont de grands plateaux calcaires d'altitude présentant une importante diversité floristique notamment en orchidées (Schatz & Jacob, 2008). La zone d'étude correspond à plusieurs stations situées entre le causse du Larzac près du Caylar (43°53'N, 3°15'E, 740m d'altitude) et le causse du Blandas (43°91'N, 3°51'E, 700m). Nous avons étudié plusieurs populations d'*Orchis mascula* (N=10), séparées entre elles de 1 à 10 kilomètres et composées de plusieurs taches de quelques dizaines à quelques centaines d'individus, ces taches étant séparées entre elles d'au minimum 10 m.

L'orchis mâle est largement réparti (toute l'Europe, ouest de l'Asie et Afrique du Nord), et elle est protégée en Belgique, Suisse, Luxembourg et dans une région du nord de la France (Bournérias & Prat, 2005). La floraison s'étend de mi-mars à fin mai dans la région

méditerranéenne. Les inflorescences sont composées de 5 à 20 fleurs (Bournérias & Prat, 2005) et mesurent environ 15 cm de hauteur dans la région d'étude. Elle fleurit précocement et elle présente une pollinisation généraliste (strictement entomogame) pouvant inclure jusqu'à 11 espèces d'insectes différents (surtout des hyménoptères et quelques coléoptères) (Nilsson, 1983 ; Cozzolino *et al.* 2005 ; Dormont *et al.*, 2010a). Du fait de sa floraison précoce, cette espèce ne profite pas de la présence d'espèces nectarifères attirant plus de pollinisateurs ; *O. mascula* est plutôt connu pour être pollinisé par des pollinisateurs naïfs, juste émergés (Nilsson, 1983).



**Figure 1.** Individu blanc dans une population d'individus pourpres d'orchis mâle.

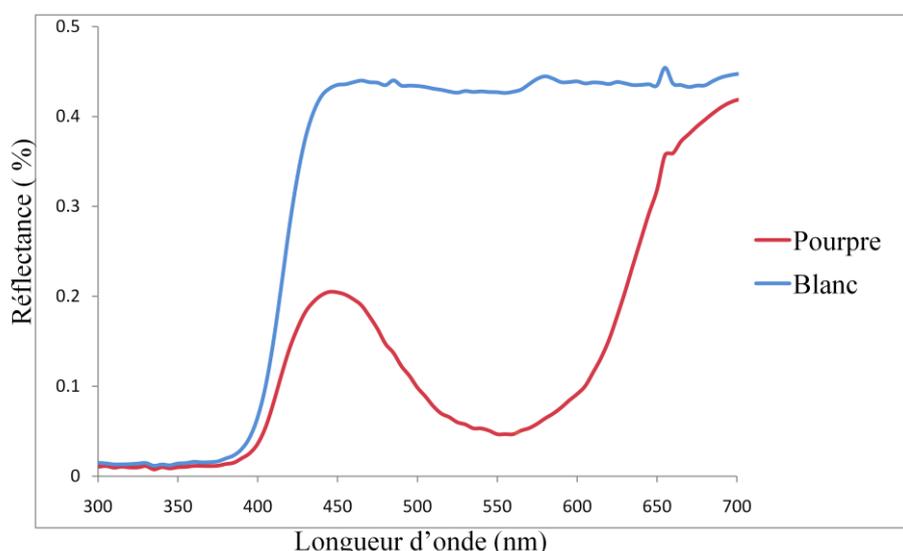
## RESULTATS

### Fréquence des individus blancs

Les populations sont généralement composées de 20 à 100 individus pourpres. Les individus blancs sont présents dans quelques-unes de ces populations, le plus souvent de façon solitaire (Fig. 1). Leur proportion de présence a été de 1,03%, 0,87% et 0,91% respectivement sur un total de 1563, 1145 et 1324 individus suivis en 2006 et 2007 (Dormont *et al.*, 2010a). Des comptages plus récents et dans d'autres secteurs respectent cette proportion de 1% d'individus blancs dans les populations d'individus pourpres.

### Analyse de la couleur

La couleur a été analysée au niveau de la plus grande largeur du labelle chez 10 individus pourpres et 10 autres blancs (Fig. 2). Les spectres de réflectance sont très différents entre les deux catégories d'individus, les blancs absorbant la lumière entre 420 et 700 nm alors que les pourpres ont un pic de réflectance à 450 nm et un autre après 650 nm. L'analyse selon le modèle de l'hexagone de Chittka & Raine (2006) des deux formes de couleur à partir des spectres moyens permet de montrer d'une part que les deux formes sont différentes pour les insectes par rapport à l'arrière plan (ou l'environnement) et d'autre part que ces deux types de couleurs sont discriminées par les insectes considérés (bourdons).



**Figure 2.** Spectre de réflectance des deux catégories d'individus chez l'orchis mâle (ligne bleu pour les individus blancs, et ligne rouge pour les individus pourpres). Analyse par spectromètre (AvaSpec-2048, lumière halogène à deutérium, mesures entre 300 à 700 nm, donc incluant les UV).

### Comparaison morphologique

Plusieurs caractères morphologiques ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse électronique (précision : 0,001mm) pour 118 fleurs d'individus blancs et 132 fleurs d'individus pourpres. Aucune différence significative n'a été détectée pour le nombre total de fleurs, la hauteur d'inflorescence, la longueur de l'épéron et la longueur du labelle, alors qu'une petite différence faiblement significative existe pour la largeur du labelle (celle-ci étant inférieure pour la forme blanche ( $8,30 \pm 1,18$ ) par rapport à la pourpre ( $8,65 \pm 1,28$ ) (Anova type III :  $F = 2,76$  ;  $p = 0,04$ ).

### Analyse de l'odeur émise

L'analyse de l'odeur émise par les deux morphes de l'orchis mâle (18 individus pourpres et 18 blancs) a été réalisée par la méthode de la micro-extraction en phase solide (SPME) pendant 1 heure sur des fibres absorbantes (PDMS-DVB 65 $\mu$ m) (Supelco) sur des inflorescences ensachées dans un sac de plastique Nalophan® inodore. Les composés piégés sur la fibre SPME ont ensuite été analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC-MS) (Varian CP-3800 / Saturn 2000).

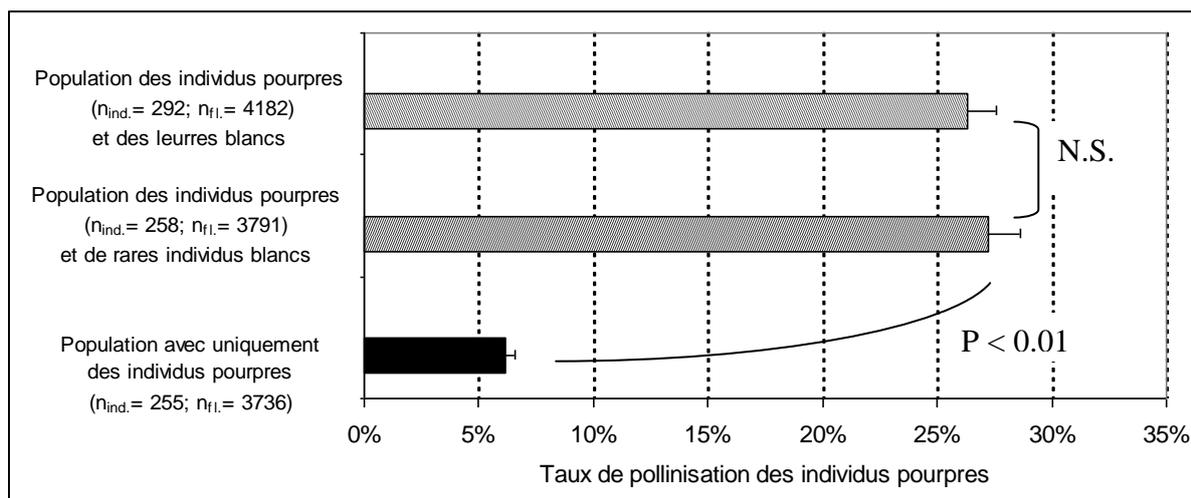
La composition chimique des émissions volatiles des individus pourpres et blancs d'*O. mascula* révèle un total de 61 composés volatils (51 et 43 pour les formes pourpre et blanche, respectivement). Le profil d'odeur des deux formes est dominé par des terpènes (64,4% pour les blancs et 67,9% pour les pourpres). Les composés majoritaires (fréquence supérieure à 10%) des deux formes sont le (E)-ocimène, le limonène, le (Z)-3-hexenyle acetate et le linalool (>10% du profil). Très peu de différences qualitatives sont observées et concernent des composés minoritaires (fréquence inférieure à 1%) dont la moitié correspond à des composés de type aromatique. Il n'y a pas de différence significative dans les proportions relatives de composés olfactifs volatils communs aux deux formes, la majorité de ces composés montrant une forte variation de leur fréquence relative dans le bouquet global.

### Effet sur le taux de pollinisation

Nous avons déterminé le taux de pollinisation (= nombre de fleurs pollinisées divisé par le nombre total de fleurs) chez 805 individus pour un total de 11709 fleurs (Fig. 3). Ce taux de pollinisation est de 6,2% pour les individus pourpres en population monochrome, de 27,2% pour les individus pourpres en population avec présence d'un individu blanc; ainsi la présence d'un individu blanc multiplie par plus de 4 fois la pollinisation des orchis mâles au sein d'une telle population. Il est également intéressant de noter que dans cette dernière situation, le taux de pollinisation des individus blancs est de 6,7% (13 individus, 180 fleurs), ce qui suggère que l'individu aide à la pollinisation de ses voisins pourpres sans favoriser la sienne.

De plus, nous avons cherché à imiter grossièrement la présence d'un individu blanc (similaire en taille et en forme à une inflorescence) en plaçant une balle de ping-pong au bout d'une tige de fil de fer vert plantée dans le sol. À notre grande surprise, la présence de ce leurre grossier permet d'obtenir un effet similaire à celui d'un individu blanc puisque ce leurre permet d'augmenter par 4 le taux de pollinisation de 26,4% (Fig. 3).

Cet effet d'un 'blanc' (individu ou leurre) est dépendant de la distance avec chaque individu considéré de la population. Ainsi, pour chaque individu pourpre, le taux de pollinisation est significativement supérieur au niveau classique (celui observé dans des populations uniquement pourpres) jusqu'à une distance de 1,6m de l'individu blanc ou du leurre blanc. Au-delà de cette distance, la présence d'un blanc (inflorescence ou leurre) n'a plus d'effet sur le taux de pollinisation des individus pourpres.



**Figure 3.** Récapitulatif des taux de pollinisation d'individus pourpres dans les différentes situations (moyenne et erreur-type ; test d'analyse de la variance ; n.s. : différence non significative).

## DISCUSSION

Cette étude a permis de révéler deux résultats surprenants, un au niveau de l'absence d'association entre la couleur et l'odeur et l'autre au niveau de l'effet des 'blanc' (individu ou leurre) sur le taux de pollinisation des pourpres. Nous montrons donc ici que le polymorphisme de couleur n'est pas associé à un polymorphisme d'odeur, contrairement à l'intuition qui voudrait que des plantes de couleurs différentes aient des odeurs différentes, comme cela a d'ailleurs été montré chez d'autres espèces (Li *et al.* 2006 ; Majetic *et al.*, 2007 ; Salzman *et al.*, 2007). Cette absence d'effet de l'odeur est indirectement prouvée par l'augmentation du taux de pollinisation par la présence des leurres, qui n'ont pas une odeur voisine de celle des orchidées. De plus, l'importance des repères visuels est également confirmée par l'importance graduelle de l'effet de la distance entre un individu pourpre et l'individu ou leurre blanc. L'attraction des pollinisateurs est donc basée sur le contraste visuel entre un individu blanc et l'environnement immédiat (vert pour l'entourage et pourpre pour les autres individus), destiné à attirer le pollinisateur naïf, inexpérimenté ou nouvellement émergé.

La conséquence de cette perception de contraste visuel parmi les fleurs à visiter est l'augmentation très importante du niveau de pollinisation des populations où est présent un individu blanc (toujours en fréquence très basse, globalement inférieure à 1%). Cette situation est différente de celle de l'orchis sureau (*D. sambucina*) dont les formes jaunes ou rouges peuvent chacune dépasser les 50% et bénéficier de l'attraction des pollinisateurs locaux par d'autres plantes nectarifères de couleur jaune ou rouge (Smithson & McNair, 1997; Gigord *et al.*, 2001). Chez l'orchis mâle, cette augmentation de pollinisation observée chez les individus pourpres et permise par la présence d'un individu blanc (qui n'en bénéficie pas lui-même) est plutôt similaire à une sélection de parentèle permise par des individus altruistes apportant un bénéfice à la population mais pas directement à eux-mêmes (Hamilton, 1964 ; Dormont *et al.*, 2010b).

Des analyses complémentaires sont en cours pour compléter la compréhension de ce mécanisme au niveau d'une part de la perception olfactive par les bourdons des deux catégories d'individus, et d'autre part du rôle des individus blancs et de leur maintien dans ces populations. D'autres études sont également en cours chez d'autres espèces d'orchidées méditerranéennes (dont beaucoup présentent également des individus à inflorescence blanche) afin de tester la généralité de ce phénomène. Nous incitons d'ailleurs tous les orchidophiles à

participer à cette étude en nous envoyant leurs informations concernant leurs observations au sujet d'espèces d'orchidées à inflorescences blanches. L'ensemble de cette étude présente des intérêts évidents en termes de conservation, notamment au niveau des espèces d'orchidées sans nectar et à faible niveau de pollinisation. Ces découvertes sont communiquées à différents gestionnaires d'espaces naturels et sont pertinentes dans le contexte actuel de réduction de présence des orchidées régionales (voir Schatz & Geniez dans ces Actes), et plus généralement d'érosion de la biodiversité en insectes pollinisateurs et en plantes pollinisées par les insectes (Biesmeijer *et al.*, 2006).

### Remerciements

Un grand merci à Bruno Buatois et Jean-Marie Bessière, ainsi qu'aux orchidophiles (Stéphane Marquis, Michel Guegou, Emeric Sulmont, Philippe Geniez) qui nous ont fait part de leurs observations d'individus blancs. Ce projet a été partiellement financé par la SFO, que nous remercions vivement ici pour leur soutien.

### Bibliographie

- Biesmeijer J.C., Roberts S.P.M., Reemer M., Ohlemüller R., Edwards M., Peeteres T., Schaffers A.P., Potts S.G., Kleukers R., Thomas C.D., Settle J. & Kunin W.E. 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and in the Netherlands. *Science* 313: 351-354.
- Bournérias M. & Prat D. 2005. Les orchidées de France, Belgique, et Luxembourg. Collection Parthénope, Biotope, Mèze. 504 p.
- Chittka L. & Raine N.E. 2006. Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 428–435.
- Cozzolino S., Schiestl F.P., Muller A., De Castro O., Nardella A.M. & Widmer A. 2005. Evidence for pollinator sharing in Mediterranean nectar-mimic orchids: absence of pre-mating barriers? *Proc. R. Soc. B.* 272: 1271-1278.
- Dormont L., Delle-Vedove R., Bessière J.-M., Hossaert-McKey M. & Schatz B. 2010a. Rare white-flowered morphs increase the reproductive success of common purple morphs in a food-deceptive orchid. *New Phytologist* 185: 300-310.
- Dormont L., Delle-Vedove R., Bessière J.-M., Hossaert-McKey M. & Schatz B. 2009. Helping in food-deceptive orchids? A possible new mechanism maintaining polymorphism of floral signals. *Plant Signaling & Behavior* (sous presse)
- Fleury J., Jacob L., Dormont L. & Schatz B. 2008. Caractérisation de l'habitat et des populations de l'Ophrys d'Aymonin, espèce endémique des Grands Causses. In : Enjeux de conservation pour les orchidées caussenardes. Schatz B. & Jacob L. (Eds.). p 44-49.
- Gigord L.D.B., McNair M.R. & Smithson A. 2001. Negative frequency-dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.). *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 98: 6253–6255.
- Hamilton W.D. 1964. The genetical evolution of social behavior, I, II. *Journal of Theoretical Biology* 7: 1-52.
- Jersakova J., Johnson S.D. & Kindlmann P. 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biol. Rev.* 81: 219-235.
- Juillet, N. 2006. Evolutionary ecology of the colour-dimorphic rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina*. Thèse de l'Université de Lausanne, 114 p.
- Li, Z. G., Lee, M. R. and Shen, D. L. 2006. Analysis of volatile compounds emitted from fresh *Syringa obovate* flowers in different florescence by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 276: 43-49.

- Majetic, C. J., Raguso, R. A., Tonsor, S. J. and Ashman, T. L. 2007. Flower color-flower scent associations in polymorphic *Hesperis matronalis* (Brassicaceae). *Phytochemistry*, 68: 865-874.
- Neiland M.R. & Wilcock C.C. 1998. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *Am. J. Bot.* 85: 1657–1671.
- Nilsson L.A. 1983. Anthecology of *Orchis mascula* (Orchidaceae). *Nord. J. Not.* 3: 157-179.
- Raguso RA. 2008. Start making scents: the challenge of integrating chemistry into pollination ecology. *Entomol. Exp. Appl.* 128: 196–207.
- Salzmann C., Cozzolino S. & Schiestl F.P. 2007. Floral scent in food-deceptive orchids: species specificity and sources of variability. *Plant Biology* 9: 720-729.
- Schatz B. 2006. Fine scale distribution of pollinator explains the occurrence of the natural orchid hybrid x*Orchis bergonii*. *Ecoscience* 13: 111-118.
- Schatz B. & Jacob L. 2008. Actes de la journée scientifique “Enjeux de conservation pour les orchidées caussenardes ». Sept. 2007, Millau, 88p.
- Smithson A. & MacNair M.R. 1997. Negative frequency-dependent selection by pollinators on artificial flowers without rewards. *Evolution* 51: 715–723.

CAHIERS  
DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE D'ORCHIDOPHILIE

N°7 - 2010



Actes du

# 15<sup>e</sup> colloque sur les Orchidées

Corum de Montpellier  
30, 31 mai & 1 juin 2009





**Actes du  
15<sup>e</sup> colloque  
sur les Orchidées  
de la  
Société Française d'Orchidophilie**

**du 30 mai au 1<sup>er</sup> juin 2009  
Montpellier, Le Corum**



**Comité d'organisation :**

**Daniel Prat, Francis Dabonneville, Philippe Feldmann, Michel Nicole,  
Aline Raynal-Roques, Marc-Andre Seloisse, Bertrand Schatz**

**Coordinateurs des Actes**

**Daniel Prat & Bertrand Schatz**

**Affiche du Colloque : Conception : Francis Dabonneville  
Photographies de Francis Dabonneville & Bertrand Schatz**

**Cahiers de la Société Française d'Orchidophilie, N° 7, Actes du 15<sup>e</sup> Colloque sur les orchidées de la Société Française d'Orchidophilie.**

**ISSN 0750-0386**

**© SFO, Paris, 2010**

**Certificat d'inscription à la commission paritaire N° 55828**

**ISBN 978-2-905734-17-4**

**Actes du 15<sup>e</sup> colloque sur les Orchidées de la Société Française d'Orchidophilie, D. Prat et B. Schatz, Coordinateurs, SFO, Paris, 2010, 236 p.**

**Société Française d'Orchidophilie  
17 Quai de la Seine, 75019 Paris**