

CIRAD-CA

UPR « Systèmes cotonniers »

University of Pretoria

University of Pretoria

Department of Plant Production
& Soil Science

**Étude des flux de gènes entre le cotonnier cultivé et les espèces voisines
dans les agrosystèmes sud africains.**

Projet « Impact des OGM », Ministère de la Recherche
MFD/AO OGM 0217

Rapport de la campagne agricole 2004-2005

Coordinateurs de Projet :

Jean-Luc HOFS (Afrique du sud)
Bernard HAU (France)

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette



000015221

Avant-propos

Ce document rassemble les résultats des études sur les flux de gènes menées sur le cotonnier en Afrique du Sud. Il fait suite et complète le rapport 2003-2004 sur ce sujet.

Les deux rapports sont des documents de travail qui serviront à élaborer le rapport final de projet qui sera présenté au Ministère français de la Recherche dans le courant du second semestre 2006.

Malgré de nombreuses corrections effectuées par le groupe d'experts du Cirad et de l'Inra, la présentation des résultats et les conclusions pourront encore faire l'objet de modifications après échanges de vues entre chercheurs.

Le document est scindé en trois parties, comme celui de l'année précédente :

Le premier chapitre contribue à l'amélioration des connaissances dans certains domaines de la biologie utilisés pour l'étude des flux de gènes :

- la morphologie du pollen de *G. hirsutum* et de *G. herbaceum* en vue de les différencier sur les insectes butineurs ;
- la viabilité du pollen dans les conditions naturelles.

L'évaluation du caractère invasif de *G. hirsutum* fait aussi partie de ce chapitre, de même que les derniers résultats sur la dispersion des cotonniers sauvages.

Les résultats de l'étude sur les possibilités d'hybridation entre *G. hirsutum* et *G. herbaceum* sont encore incomplet et seront présentés ultérieurement.

Le second chapitre poursuit l'inventaire des insectes floricoles du cotonnier dans les trois principales zones de production cotonnière en Afrique du Sud. A cette étude s'ajoutent celles de la charge de pollen des taxa les plus abondants et de la mobilité d'*Astylus atromaculatus*, espèce peu citée dans les recensements mais fréquente dans les régions de moyenne altitude.

Le troisième chapitre traite de la dispersion du pollen dans des populations homogènes et hétérogènes de cotonnier. Ces résultats font suite et complètent ceux présentés en 2003-2004.

Les Annexes renferment les documents originaux ayant servi à la rédaction du rapport : manuscrits des étudiants et chercheurs impliqués dans le projet, photos, inventaires....

Jean-Luc Hofs

Table des matières

Avant-propos	2
Chapitre I : Etude des espèces capables de se croiser avec le cotonnier cultivé	5
Compléments d'inventaire des spécimens d'herbier	5
Comparaison morphologique du pollen de <i>G. hirsutum</i> , <i>G. herbaceum</i> et deux <i>Hibiscus</i>	6
Viabilité du pollen de cotonnier en conditions naturelles	9
Populations sauvages de <i>G. hirsutum</i>	13
Dispersion de gènes en milieu naturel	21
Production d'hybrides à partir de <i>G. hirsutum</i> et de <i>G. herbaceum</i>	22
Chapitre II : Etude des insectes pollinisateurs du cotonnier en Afrique du Sud	27
Travaux menés en 2004-2005	27
Bref rappel de la biologie florale et de la pollinisation du cotonnier	28
Etude des pollinisateurs dans la région de Marble Hall	29
Etude des pollinisateurs dans la région de Rustenburg	32
Etude des pollinisateurs dans les Makhathini Flats	36
Etude partielle de la capacité de transport de pollen chez les principaux insectes rencontrés dans les fleurs de cotonnier	41
Distance de vol d'un insecte pollinisateur	43
Les principaux insectes visiteurs de <i>Gossypium</i> et <i>Hibiscus</i> sauvages en Afrique du Sud	46
Discussion générale et conclusion de l'étude entomologique	48
Chapitre III : Estimation de la dispersion du pollen dans des populations de cotonniers	55
Etude bibliographique	55
Etude de terrain	56
Essai de dispersion dans une population homogène de cotonniers à Rustenburg	58
Essai de dispersion dans une population homogène de cotonniers à Makhathini	67
Essai de dispersion dans une population non homogène de cotonniers à Rustenburg	73
Approche globale de la dispersion	79
Discussion générale et conclusion	89

18 AVR. 2006

ANNEXES

Annexe I : Spécimens d'herbier (suite)

Annexe II : Pollen viability and longevity test of transgenic cotton

Annexe III : Pollen morphology of selected Malvaceae species

CHAPITRE I

Etude des espèces capables de se croiser avec le cotonnier cultivé

J-L Hofs^a, D. Marais^b & Melake Fessehazion^b

a : Cirad-Ca, UPR Systèmes cotonniers, Montpellier, France

b : Université de Pretoria, Dept. Plant Production and Soil Science, Afrique du Sud.

Complément d'inventaire des spécimens d'herbier

Un complément d'information sur les sites de collecte des spécimens d'herbier mentionnés dans le rapport de 2003-2004 est présenté en annexe 1. Il s'agit des références concernant *Gossypium barbadense*, *G. herbaceum* et *Abelmoschus esculentus*.

18 AVR. 2006

Comparaison morphologique du pollen de *G. hirsutum*, *G. herbaceum* et deux *Hibiscus*

L'intérêt d'une telle étude réside dans la détermination de critères d'identification du pollen pour l'étude des flux de gènes. L'identification du pollen est importante lorsque l'on veut connaître ses distances de dispersion par les insectes. Deux moyens se présentent au chercheur. Les pollens « étrangers » peuvent être identifiés sur l'espèce ou la plante réceptrice ou bien peuvent être détectés sur des insectes après capture à une distance donnée d'une source d'émission. L'identification et la différenciation des grains de pollen au niveau de l'espèce au moyen du microscope photonique n'a pas pu être réalisée tant les critères à prendre en considération présentent des similitudes (G.R D'albore 1998). La mise en évidence de différences morphologiques n'a pu se faire qu'au moyen de la microscopie électronique à balayage.

Rappel d'histologie

Le gamétophyte mâle d'angiosperme a une structure relativement complexe. Les parois sont faites de deux couches principales : l'exine (côté interne) et l'intine (côte interne). L'exine qui fait l'objet de l'étude morphologique est composée de sporopollenine et de faibles quantités de polysaccharides. Cette couche est très stable chimiquement et résiste à une variété de conditions adverses. C'est sur cette couche que les pores (circulaires ou allongés) sont visibles. L'exine est composée de 2 sous-couches : la sexine et l'intine. La sexine est le support du relief du grain de pollen alors que l'intine apparaît comme une paroi lisse.

La sexine est encore divisée en deux parties : le *tectum* et les *baculi*. La coupe transversale de la paroi du grain de pollen (voir annexe) peut se comparer à un toit comportant différents dessins ou reliefs (*tectum*) supporté par de petites colonnes (*baculi*) reposant sur un plancher lisse (nexine).

Matériel et méthode

- source de pollen

Quatre espèces ont été étudiées. Dans le Genre *Gossypium*, *G. hirsutum* (cultivar Opal RR) et *G. herbaceum* (cultivar) ont été comparés. L'étude a été complétée par l'observation de deux *Hibiscus* fréquents en Afrique du Sud : un sauvage présent dans les zones de culture, *H. trionum* et un cultivé, *Abelmoscus esculentus* pour lesquels nous n'avions pas de données extrêmement détaillées (exception faite de Vaissière et Vinson, 1994).

- Acétolyse

L'acétolyse détruit le matériel pollinique à l'exception de la sporopollenine, constituant majeur de l'exine responsable de l'aspect du grain. Le protocole de préparation des grains pour l'observation au microscope électronique est donné de façon détaillée dans l'annexe 2. Plus brièvement, la méthode consiste à débarrasser la couche extérieure du grain des tissus non indispensables à l'observation en immergeant les grains dans de l'acide acétique glacial et en les centrifugeant ensuite. Ces opérations sont répétées plusieurs fois jusqu'à obtention d'un objet propre.

- Observations

Les observations ont porté sur cinq caractères morphologiques :

- Taille du grain de pollen,
- Nombre et position des pores,
- Longueur et nombre des aiguilles,
- Elévation de la base de l'aiguille,
- Le rapport de l'épaisseur tectum/baculi/nexine

Résultats

1) Comparaison entre genre

La taille du pollen chez *Hibiscus* (et *Abelmoschus*) est supérieure à celle de celle observée chez *Gossypium*. Les pores y sont également plus nombreux et d'un diamètre plus grand. Les aiguilles de *Hibiscus* sont plus longues mais moins nombreuses.

2) Comparaison entre *G. hirsutum* et *G. herbaceum*

Un premier examen montre que le diamètre du grain est plus grand chez *G. hirsutum*. Il présente moins d'aiguilles ce qui lui donne un aspect moins hérissé que *G. herbaceum*. L'observation détaillée de la paroi montre des rapports S/N et T/B/N différents.

Le critère de morphologie des pores n'est pas déterminant du fait de la variabilité intraspécifique.

Tableau 1-1: Caractéristiques des grains de pollen de *G. hirsutum*, *G. herbaceum*, *A. esculentus*, et *H. trionum* mesurées en μm au « Scanning Electron Micrograph »

Pollen		<i>Gossypium</i>		<i>Hibiscus</i>	
		<i>G. hirsutum</i>	<i>G. herbaceum</i>	<i>H. esculentus</i>	<i>H. trionum</i>
Size	Diameter	104-109	84-93	163-171	172-180
Spine	Length	6.2	6.7	20.8	19.4
	Number	144-152	192-214	114-118	94-98
	Elevated	Yes	Yes	No	No
Layers	<i>Nexine</i>	1.05	1.74	1.83	2.91
	<i>Baculi</i>	1.38	1.96	2.50	1.25
	<i>Tectum</i>				
	<i>Sexine:Nexine</i>	2:1	1:1	1.5:1	1:1.5
	<i>Tectum:baculi:nexine</i>	3:4:1	5:6:1	4:6:1	6:3.5:1
Aperture	Number	12-16	10-14	26-28	46-48
	Length	6.2-6.6	5.5-7.4	10.3-12.7	8.7-9.6

Conclusion

La comparaison ou l'identification du pollen des deux espèces de cotonnier n'est pas réalisable avec un matériel simple mais nécessite l'observation au microscope électronique. Les critères morphologiques pourront être utilisés pour des études ponctuelles ou des suivis spécifiques en matière de biovigilance.

Viabilité du pollen de cotonnier en conditions naturelles

Comme il a été abordé dans le rapport 2003-2004, la fécondation croisée chez le cotonnier dépend de l'abondance de l'entomofaune pollinisatrice dans un milieu donné. Sa réussite sera également conditionnée par la durée du transport d'un champ source vers un champ récepteur. Il est important donc de connaître la viabilité du pollen en condition naturelle sous des températures et degré d'hygrométrie rencontrés à l'extérieur, sur le terrain. Les études sur la viabilité réalisées précédemment sur les espèces cultivées visaient à mettre au point des méthodes de conservation du pollen pour en augmenter la longévité (Bolat et Pirlak, 1999, Barrow, 1983) ou améliorer la composition des milieux germinatifs (Barrow 1981, Almeida, 1985). Il existe peu d'information concernant la conservation en conditions naturelles et l'évolution au cours du temps. Fisher (1975) s'est attaché à l'étude de l'influence de la température sur la fertilité du pollen de certains cultivars upland en Arizona. Acala 1517V s'est avéré être le plus thermosensible. L'auteur indique que l'usage de l'irrigation a un effet sur la restauration d'un bon niveau de fertilité plus par l'effet de refroidissement de l'air ambiant que par l'effet de l'accroissement de l'humidité (Stockton et Walhood, 1960).

Une fois déposé sur le sommet du style (site plus favorable à sa germination en comparaison avec la partie basale [Iyengar, 1938]), le grain de pollen fertile doit encore germer dans des conditions favorables. Le pollen des espèces asiatiques et américaines germe 30 minutes après le contact avec le stigmate (Pundir, 1972). Le taux de croissance du tube pollinique est bas durant les deux premières heures lorsque le tube traverse le tissu du stigmate. La vitesse de croissance s'accélère ensuite (3mm/h) lorsque le tube pénètre dans le style proprement dit puis s'infléchit à nouveau à l'arrivée aux ovaires (Iyengar 1938, Pundir 1972). Dans le cas des croisements interspécifiques, les vitesses de pénétration sont différentes. Lorsqu'un grain de pollen de *G. hirsutum* germe sur le stigmate de *G. arboreum*, on assiste à un ralentissement de la vitesse par rapport à un croisement intraspécifique. Dans le sens inverse du croisement, lorsque le pollen de *G. arboreum* est utilisé, la vitesse de pénétration est sensiblement plus grande (Pundir 1972). L'impact de l'environnement sur la germination du pollen a été étudié par Suy (1979). L'intensité lumineuse n'aurait pas d'effet sur la croissance du tube mais la composition de la lumière (rouge-6500A) pourrait avoir un effet stimulant. L'humidité relative comprise entre 55 et 80 pourcent n'affecte pas le développement du tube mais des conditions plus sèches de l'ordre de 30% auraient un effet négatif. Suy (1979) établit que la température est le facteur le plus important pour la croissance du tube pollinique. Il observa que le taux d'élongation est nul en dessous de 19°C et au-dessus de 45°C. La température idéale serait de 37°C. La grande sensibilité des grains de pollen à l'eau ne permet pas la fécondation lorsqu'il pleut durant les quatre premières heures après l'anthèse.

Matériel et méthode

- origine du matériel

Le pollen a été prélevé sur des plantes de cotonnier, variété Opal RR, cultivés en serre à une température moyenne de 25°C.

- récolte du pollen

Le pollen est récolté en prélevant les fleurs ouvertes lors de l'ouverture des sacs polliniques, entre 10 et 11 h du matin. Les fleurs sont déposées au laboratoire à température du local (22-25°C). les grains de pollen sont soumis aux traitements aux intervalles suivants : 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 et 72 heures après anthèse.

- coloration d'Alexander

Cette méthode est utilisée comme test préliminaire pour évaluer la maturité des grains avant de conduire les tests de viabilité (Dafni, 1992). Une goutte de milieu est déposée sur une lame porte-objet et le pollen y est saupoudré dessus. La préparation recouverte d'une lame couvre-objet est mise à incuber à 50°C durant 24 h. L'observation des grains se fait au binoculaire 10x. Le pollen mûre se colore en rouge-orange tandis que le pollen immature prend une coloration verte. Un pourcentage est calculé après comptage des deux types de grains.

- test au chlorure de tetrazolium (TTC)

Ce test a été réalisé d'après Barrow (1983). Après 2 heures d'incubation, on procède à l'observation du pollen. Le pollen viable se colore en rose.

- germination in vitro

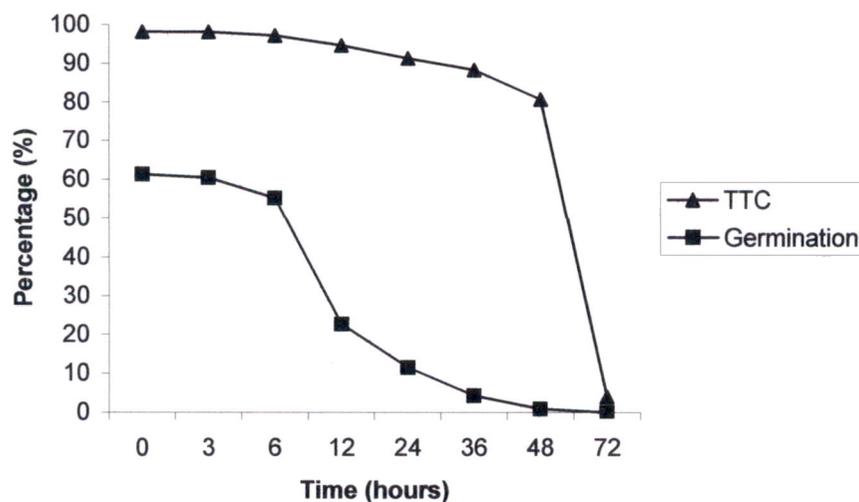
Le test de germination in vitro a été réalisé selon la méthode de Taylor (1972) modifiée en raison du taux élevé d'avortement.

La solution de sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) utilisée à été portée à une concentration de 40% au lieu de 25% comme indiqué dans Taylor (1972). Le Ph de la solution a été porté à 7.6 alors que l'auteur n'apporte aucune spécification à ce sujet. Enfin, Taylor (1972) mentionne une humidité d'incubation de 100% (relative humidity (RH)) alors que nous avons observé de meilleurs résultats à 76% RH en appliquant du NaCl saturé.

Résultats

La viabilité maximale du pollen est obtenue lorsque les grains viennent d'être libérés des sacs polliniques. En 1981, Barrow obtint 98% dès l'anthèse. Lors de notre expérimentation, nous avons également obtenu ce pourcentage via le TTC alors que la germination in vitro ne révéla que 61%. Dans les 2 tests, les pourcentages décroissent dans le temps (figure 1-1). Les taux de germination du pollen décroissent significativement 6 heures après la déhiscence des anthères. Une chute drastique de taux intervient 48 heures après l'anthèse et la majorité des grains n'est plus viable après 72 heures.

Figure1-1 : évolution de la viabilité des grains de pollen de cotonnier selon deux méthodes : test au chlorure de tetrazolium et germination in vitro.



Conclusion

Le pollen de cotonnier maintient un taux de viabilité satisfaisant durant plus de 6 heures après déhiscence des anthères. Ce taux peut être considéré comme faible après 24 heures mais certains grains maintiennent leur activité germinative au-delà de 36 heures. Dans de bonnes conditions environnementales, ce pas de temps permet à un insecte de déplacer des grains viables sur des distances relativement longues.

Références

- Almeida, F.C.G. 1985.** Effects of short-term storage on viability of pollen from cotton, *Gossypium hirsutum* L. Dissertation Abstracts International B (Sciences and Engineering). 45, 8, 2386B.
- Barrow, J.R. 1981.** A new concept in assessing cotton pollen germinability. *Crop Science*, 21:441-443.
- Barrow, J.R. 1983.** Comparison among pollen viability measurement methods in cotton. *Crop Science*, 23:734-736.
- Bolat H., Pirlak L. 1999.** An investigation on pollen viability, germination and the tube growth in some stone fruits. *Tr.J.of Agriculture and Forestry* 23: 383-388.
- Dafni, A. 1992.** *Pollination Ecology: The Practical Approach*. Oxford University Press.
- D'Albore G.R. 1998.** Mediterranean melissopalynology. Università degli studi di Perugia. Facoltà di agraria. Istituto di entomologia agraria, pp. 466.
- Fisher, W.D. 1975.** Heat induced sterility in upland cotton. Proc.Beltwide Cotton Prod. Res. Conf. pp. 85
- Iyengar, N.K. 1938.** Pollen-tube studies in *Gossypium hirsutum*. *J. Genet.* 37:69-107.
- Pundir, N.S.1972.** Experimental embryology of *Gossypium arboreum* L. and *G. hirsutum* L. and their reciprocal crosses. *Bot.Gaz.*133: 7-26.
- Stockton J.R., Walhood V.T. 1960.** Effect of irrigation and temperature on fiber properties. Proc. 14th Ann. Beltwide Cotton Defol. Physiol.Conf. pp. 11-14.
- Suy T.B.1979.** Contribution de l'étude de la croissance des tubes polliniques chez *Gossypium hirsutum* L. en fonction des conditions du milieu. *Cot. Fib. Trop.* 34 : 295-300.
- Taylor, R.M. 1972.** Germination of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) pollen on an artificial medium. *Crop Science*, 12:243-244.
- Vaissière B, Vinson B. 1994.** Pollen morphology and its effect on pollen collection by honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), with special reference to upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae). *Grana* 33:128-138.

Populations sauvages de cotonniers *G.hirsutum*

En matière de dissémination involontaire de matériel végétal, la propagation de plantes échappée de culture ou encore appelées «volontaires» est à prendre en compte lors de l'évaluation des risques. En l'absence de contrôle, des populations sauvages de cotonniers pourraient se développer et proliférer.

Nous nous sommes attachés à étudier deux aspects de ce risque : la probabilité d'établissement de plantes volontaires en conditions non cultivées et l'évaluation a posteriori de la fréquence de plants volontaires.

Probabilité d'implantation de *G. hirsutum* sauvages

Introduction

Les populations sauvages proviennent généralement de graines tombées, non récoltées au champ. Le développement de la récolte mécanique du coton engendre des pertes en coton-graine importantes, de l'ordre de 10% de la récolte. Ces graines, si le champ est laissé en friche, peuvent germer et donner lieu à des plants de cotonniers capables de donner une nouvelle descendance. Les bas côtés de routes consistent en un autre endroit de prédilection pour les plantes volontaires. Le coton-graine venant du champ et acheminé à l'usine d'égrenage ou les graines transportées à l'huilerie ou dans les feed-lots tombent des remorques pour finir en bord de route. Là, si elles rencontrent des conditions propices à la germination, elle se développent jusqu'au stade reproductif.

Nous avons mené une petite expérimentation destinée à évaluer le pourcentage de semences germées et le nombre de plants capables de se développer sans préparation de semis. Cet essai consistait à semer du matériel végétal sur différents types de substrat en simulant ce qui peut se passer en bord de route.

Matériel et méthode

Le matériel végétal utilisé était de deux ordres : des graines délintées de la variété NuOpal (transgénique Bt) et du coton-graine (coton brut récolté au champ) de la même variété. Les deux matériels avaient été récoltés deux ans auparavant. Ce choix délibéré a été conditionné par le souci de connaître le comportement germinatif dans une situation relativement extrême.

Le matériel végétal était constitué de 100 graines, déposées sur une placette élémentaire de 20 cm x 20 cm.

Le matériel a été évalué sur quatre substrats :

- 1) sol sablo-argileux, graine enfouie sous 1cm de terre (SGE),
- 2) sol sablo-argileux, graine déposée sur un sol ameubli sous le passage d'un rateau (SM),
- 3) sol sablo-argileux, graine déposée sur un sol compacté (SC),
- 4) couverture de graminées de 3 cm d'épaisseur sur un sol sablo-argileux meuble (CV).

Le dispositif expérimental était un split-plot de 9 répétitions.

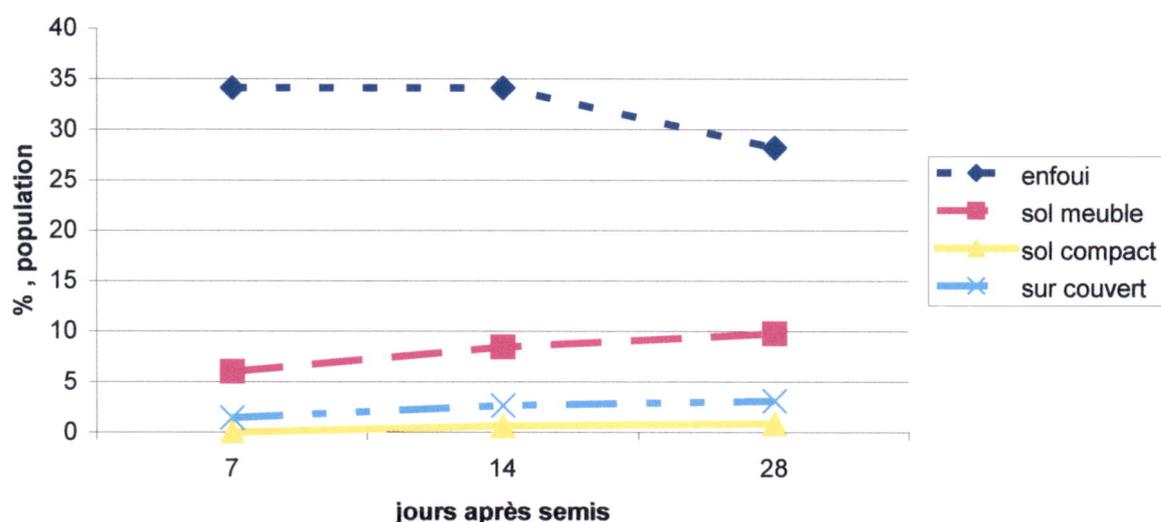
La germination puis le développement des plantules n'a reposé que sur la pluviométrie (220 mm en 45 jours répartis en 60 mm avant « semis » et 160 mm après semis soit 35 jours). Le matériel n'a pas reçu d'apport supplémentaire en eau.

Trois comptages ont eu lieu 7 jours après le début de l'émergence, 14 jours et 28 jours. Pour la fréquence de germination, les données ont été reportées sur 100 graines.

Résultats

Les graines délintées (figure 1.2) germent rapidement lorsqu'elles sont enfouies sous une mince couche de terre. La germination atteint des pourcentages de l'ordre de 34 % malgré l'âge des semences. Lorsque les graines sont déposées sur le sol, la germination est plus lente et atteint des niveaux différents selon les caractéristiques physiques du substrat. Dans ce cas, la germination est retardée et plus lente qu'avec des graines enfouies et des graines germent encore 20 jours après « le semis ».

Fig. 1.2: Pourcentage de germination et évolution de la population de cotonniers "volontaires" en fonction du substrat: graine délintée



La probabilité d'obtenir des plantules, après 28 jours, à partir de graines déposées sur sol meuble est de 9.7%. Cette probabilité décroît à 3% dans le cas de la germination des graines sur un couvert végétal, c'est-à-dire sans contact direct avec la terre. La germination sur sol compacté est beaucoup plus improbable et se réalise dans moins de 1% des cas.

La germination du coton-graine est nettement moins bonne que celle de la graine (figure 1.3). Le coton-graine enseveli présente une probabilité de développement de 3 % et de 0.4 % sur sol meuble. Aucune plantule n'a pu se développer tant sur sol compacté que sur couverture végétale.

Fig. 1.3: Germination et évolution de la population de cotonniers "volontaires": coton-graine

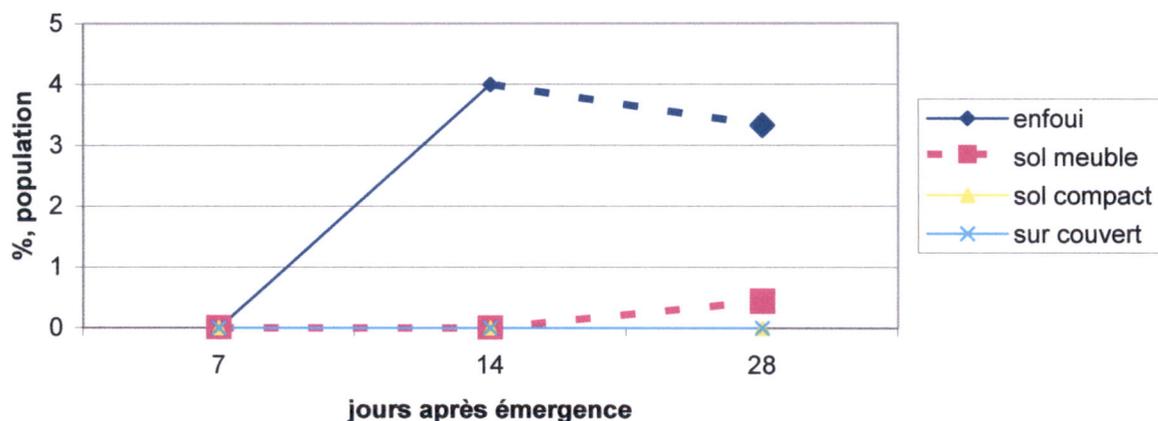


Tableau 1-2 : Graines délintées. Fréquences de germination et évolution de la population de plantules de cotonnier semées sur 4 substrats.

Substrat	Jours après émergence de la première plantule		
	7	14	28
Sol Graine Enfouie	34.11 ± 3.90 a	34.11 ± 4.12 a	28.2 ± 5.13 a
Sol Meuble	6.0 ± 3.11 b	8.44 ± 4.27 b	9.77 ± 5.08 b
Sol Compact	0 ± 0 c	0.66 ± 1.04 c	0.89 ± 1.18 bc
Couvert Végétal	1.44 ± 1.92 c	2.66 ± 2.29 c	3.11 ± 3.46 c

Tableau 1-3: Coton-graine . Fréquences de germination et évolution de la population de plantules de cotonnier semées sur 4 substrats.

Substrat	Jours après émergence de la première plantule		
	7	14	28
Sol Graine Enfouie	0 ± 0	4.0 ± 2.66 a	3.33 ± 2.22 a
Sol Meuble	0 ± 0	0 ± 0 b	0.44 ± 0.69 b
Sol Compact	0 ± 0	0 ± 0 b	0 ± 0 b
Couvert Végétal	0 ± 0	0 ± 0 b	0 ± 0 b

Les valeurs présentant des lettres différentes sont significativement différentes au niveau 0.05 (test de Tukey –HSD).

Fréquence de plants transformés hors champ

Au courant de la saison 2003-2004, nous avons repéré des populations sauvages de *G.hirsutum* en bordure de route et notamment le long de l'axe Groblersdal-Marble Hall-Potgietersrus (N11). Ces plantes formaient des peuplements relativement denses et se développaient sans trop de difficultés. Elles arrivaient à produire 5 capsules par plant, en moyenne.

En 2004-2005, des échantillonnages ont été réalisés afin de détecter parmi ces volontaires le taux de matériel transgénique. Deux méthodes distinctes d'identification ont été utilisées de façon indépendante selon la nature des cotonniers transgéniques.

Echantillonnage

Dix placettes de 5 mètres de large sur 15 mètres de long ont été choisies aléatoirement et délimitées de part et d'autre de la N11 entre le kilomètre 30 et 20 entre Marble Hall et Potgietersrus. Les coordonnées GPS sont : S 24°52'984 /E 29° 10'337. Le nombre de cotonniers a été noté ainsi que les autres espèces échappées.

Détection

Dans un premier temps, les premières capsules ouvertes des plantes ont été récoltées pour des fins d'analyses ultérieures de la protéine Bt. Trois lots de semences ont été récoltés (tableau 1-4).

Tableau 1-4 : nombre de graines récoltées sur des plants présentant 100% de capsules saines

Date	Lieu	Nombre de graines
07/02/2005	Pont de l'Elands river Marble Hall	65
10/02/2005	N11 Marble Hall - Potgietersrus	70
15/02/2005	N11 Marble Hall (avant carrefour avec N33)	170

Dans le cas de la détection de plants résistants à l'herbicide Round Up (Monsanto), les cotonniers ont été traités au Round up après la phase de récolte des premières graines. La concentration de Glyphosate utilisée était de 360g/l. La pulvérisation a été réalisée par temps sec aux premières heures de la matinée afin de profiter d'une bonne ouverture des stomates et éviter l'état de stress des plantes fréquemment observé en milieu de journée.

La lecture du screening a été effectuée 10 jours après le traitement. Seuls les plants présentant un aspect « brûlé » ont été comptabilisés parmi les plants non résistants.

Résultats

La densité moyenne de population des cotonniers volontaires dans les échantillons observés est de 1 plant par 4.5 m².

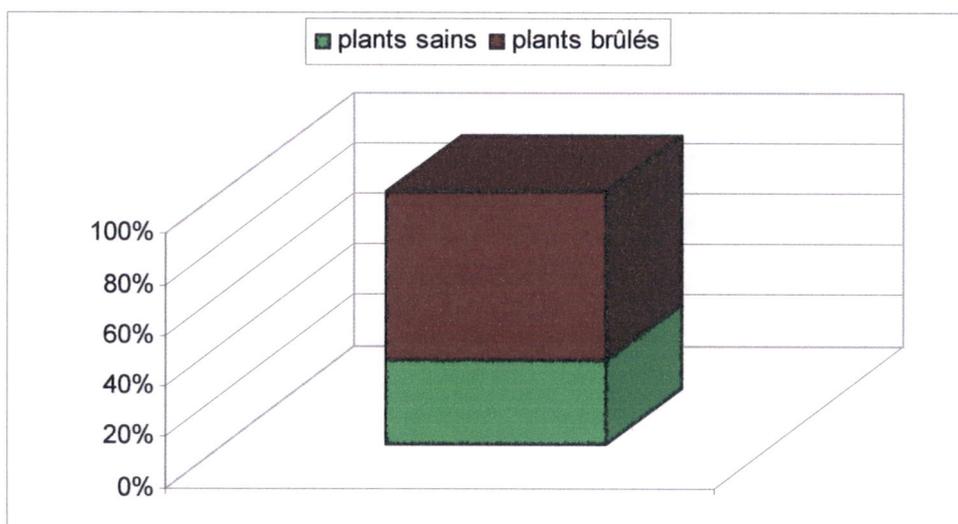
1) Les cotonniers Bt

Les graines ont été envoyées en janvier 2006 au laboratoire de biotechnologie de l'Inra à Versailles pour la détection de la protéine Bt. Les résultats seront présentés ultérieurement.

2) Les cotonniers RR

Sur un total de 202 plantes traitées au Glyphosate, 67 ne présentaient pas de signe de flétrissement marqué ou de brûlures dues à l'herbicide. Le pourcentage moyen de plants résistants est de 26.89 % ± 29.61 (figure 1-4).

Figure 1-4 : Proportion de plants de cotonnier résistants au RoundUp en bordure de route à Marble Hall



Persistance des populations de cotonniers

Les cotonniers « volontaires » de la région de Marble Hall ont été suivis durant deux ans. Durant la période de végétation (été), l'entretien des bas-côtés peut être réalisé par pulvérisation d'un herbicide total (Round Up notamment). Mais les contraintes budgétaires des provinces ne permettent pas un contrôle généralisé de la végétation en bordure des routes. Durant l'hiver (juillet-septembre), les abords des routes sont entretenus soit par brûlage soit par passage d'une lame. Les plants de coton résistent généralement au passage de la lame grâce à leur enracinement profond (photo 1).

D'autres populations sont implantées dans l'asphalte aux abords des ponts (photo 2) et ne font apparemment pas l'objet d'éradication. Ces populations proviennent d'un mode de germination original : des graines sont déposées en tas sur l'asphalte ; le tas de graine se décompose produisant un compost relativement riche et quelques graines saines germent ; les

plantules s'enracinent dans le compost et prennent vigueur ; par la suite la racine pivotante est suffisamment forte pour traverser le bitume.

Dans tous les cas, les plantes accomplissent leur cycle complet.

Dans le KwaZulu Natal, des plants échappés de culture se rencontrent également en bordure de route.



Photo 1

Cotonniers survivant
au passage de la
lame

Photo 2



cotonniers

Graines
compostées

Discussion

En zone de production cotonnière, on note une présence non négligeable de variétés de cotonniers *G. hirsutum* en bordure de route. Parmi ces plantes, certaines ont été identifiées comme résistantes au Glyphosate. L'occurrence de plants Bt sur le site doit encore être analysée.

Le cotonnier cultivé n'est pas considéré comme une espèce envahissante ou du moins cet aspect a été relativement ignoré jusqu'à l'avènement des cultivars transgéniques. Sur un subcontinent tel que l'Australie ou le genre *Gossypium* est bien représenté, ils ne sont pas connus comme étant une source de problème pour l'agriculture ou l'environnement (Tothill et al. 1982 ; Keeler et al. 1996 ; Lazarides et al. 1997). *G. hirsutum* ne possède pas les caractéristiques généralement associées à une espèce envahissante : dormance des graines, persistance et longévité des graines dans le sol (soil seed bank), germination en conditions adverses, croissance rapide, cycle court, rendement semencier élevé, forte dispersion des graines sur de longues distances (Keeler 1985 ; Keeler 1989). Cependant notre étude montre que des populations férales de cotonniers existent, relativement pérennes et persistantes, dans les zones de production sud africaines.

Pour les formes transgéniques, des études récentes ne semblent pas se prononcer sur un renforcement du caractère envahissant (Eastick, 1999). Dans le cas du cotonnier résistant à l'herbicide RoundUp (Glyphosate), l'avantage de sélection que confère ce caractère ne semble pas présenter une menace en Afrique du Sud. En effet, l'entretien des accotements est plus souvent réalisé par des gyrobroyeurs ou lames niveleuse. Il n'en demeure pas moins possible qu'un entretien chimique soit programmé ponctuellement dans des endroits accidentés et rocailleux (cas observé dans le KwaZulu natal, le long de la rivière Pongola).

En ce qui concerne les cotonniers Bt, leur présence sous la forme de populations (groupes de plantes) dans le milieu naturel suscite plus d'inquiétude quant à leur effet sur l'accélération d'un éventuel développement de la résistance des chenilles carpophages au gènes Bt (Cry1Ac et Cry2Ab). A ce titre, Green et al (2003) estiment que le bush sud africain renferme suffisamment d'espèces sauvages indigènes hôtes de *Helicoverpa armigera* que pour maintenir des populations non résistantes. La présence de cotonniers Bt dans le milieu naturel pourrait dès lors réduire l'efficacité de ce refuge naturel, si son abondance et son efficacité sont toutefois confirmées.

Références

Eastick R. 2002. The potential weediness of transgenic cotton in Northern Australia. Northern Territory Gov. Dep. of Business Industry and Resource Development. CSIRO. Technical Bull.305. 199 p.

Green W.M., de Billot M.C., Joffe T., van Staden L., Bennett-Nel A., du Toit C.L.N., van der Westhuizen L. 2003. Indigenous plants and weeds on the Makhathini flats as refuge host to mainatin bollworm population susceptibility to transgenic cotton (BollgardTM). African Entomology, 11(1):21-29.

Keeler K.H. 1985. Implications of weed genetics and ecology for the deliberate release of genetically engineered crop plants. Recombinant DNA Technical Bulletin 8:165-172.

Keeler K.H. 1989. Can genetically engineered crops become weeds. Biotechnology 7:1134-1139.

Keeler K.H., Turner C.E., Bolick M.R. 1996. Movement of crop transgenes into wild plants. In herbicide resistant plants. CRC Press Inc.

Lazarides M., Cowley K., Hohnen P. 1997. CSIRO Handbook of Australian Weeds. Canberra, ACT.

Tothill J.C., Mott J.J., Gillard P. 1982. Pasture weeds of the tropics and subtropics with special reference to Australia. In Biology and Ecology of Weeds. Dr. J. Junk Publishers, The Hague, pp 403-427.

Dispersion de gènes en milieu naturel

Plusieurs capsules de *G. herbaceum* var. *Africanum* ont été récoltées à des endroits différents, à proximité de périmètres de culture cotonnière, en milieu villageois sur les Makhathini Flats. Ces récoltes se sont échelonnées sur deux saisons (tableau 1-5).

Tableau 1-5 : nombre de graines récoltées sur *G. herbaceum* à proximité de champs de coton à Makhathini Flats

Date	Lieu	Nombre de graines
Mars 2004	Makhathini	52
Avril 2004	Makhathini G.G.	280
Avril 2004	Makhathini Kwajobe	50
Janvier 2005	Makhathini	70
	Makhathini Kwajobe	34
	Makhathini G.G.	80

Les graines délintées ont été envoyées à l'Inra de Versailles afin d'être mises à germer. Au stade 3 feuilles, les plantules entières ou en partie seront envoyées à l'Inra de Rennes pour y être analysées au cytomètre de flux. Cette opération permettra de détecter la présence d'hybrides interspécifiques. Un rapport est attendu en juin 2006.

Production d'hybrides à partir de Gossypium hirsutum et de G. herbaceum.

Etude bibliographique

L'obtention d'hybrides fertiles à partir de *G. hirsutum* et d'espèces sauvages est pratiquement impossible sans avoir recours à des traitements au moyen de substances mitoclasiques (Meyer 1974). Brubaker et al. (1999) démontrent que, dans le meilleur des cas, le résultat d'un croisement naturel de cotonniers sauvages australiens avec le cotonnier cultivé n'aboutit qu'à la production d'hybrides stériles. Cependant un nombre limité de publications mentionne la possibilité de formation et de fonctionnement de gamètes non réduits entre le cotonnier cultivé upland et les espèces de cotonniers asiatiques parmi lesquelles *G. herbaceum* (Skovsted 1933). L'auteur mentionne l'existence d'hybrides F1 possédant 52 et 65 chromosomes et signale que des augmentations du nombre de chromosomes a été plusieurs fois observé dans des gamètes issus d'hybrides interspécifiques possédant 39 chromosomes (Skovsted 1934). D'après Iyengar (1945), ces hybrides n'ont jamais produit de capsules soit par autofécondation, soit par rétrocroisement avec un cotonnier diploïde. Cependant une descendance est assurée lorsqu'un parent *G. hirsutum* est utilisé (Amin 1940 a,b). L'étude de croisements entre *G. hirsutum* et *G. armourianum* a mis en évidence des hybrides fertiles hexaploïdes de faible fertilité sans qu'il y eu quelconque traitement (Brown 1951). Le même auteur note que l'hexaploïde évoluera naturellement en tétraploïde et peu vraisemblablement à un diploïde. Dans l'hypothèse qu'un tel croisement aboutisse avec *G. herbaceum* pris comme parent femelle, le plant hybride possédera moins de pollen viable que si l'espèce sauvage est donneuse de pollen (Meyer 1973). En ce qui concerne les cotonniers diploïdes sauvages américains tel que *G. thurberi*, les tentatives d'hybridation ont été un échec donnant lieu à des plants mâle et femelle stériles (Beasley 1942). La restauration de la fertilité n'a pu se réaliser que par doublement du stock de chromosomes produisant un plant hexaploïde (Beasley 1942, Brown et Menzel 1952, Gerstel 1956, Gerstel et Phillips 1958). La formation de gamètes non réduits chez les hybrides triploïdes est peu fréquente mais possible et a été mentionnée pour certains croisements entre *G. hirsutum*, *G. exiguum* et *G. nobile* (Brubacker et al 1999).

Tentative d'hybridation artificielle

Un essai de croisements avait été tenté avec des abeilles en cage, sous serre, à Pretoria, en 2003-2004, entre *G. hirsutum* (RR) et *G. herbaceum* var. *africanum* provenant de récoltes réalisées en 1998 dans le Parc Kruger (NI/banque de gène Cirad B/G7335 et 7399). Les graines de cotonnier sauvage avaient germées mais les plants obtenus n'avaient pas fleuri empêchant toute tentative de croisement.

Durant la saison 2004-2005, une nouvelle variété « Boumi Aria » (type commercial) de *G. herbaceum* a été semée en serre. Son développement a permis la poursuite du programme d'hybridation interspécifique. 40 plants de chaque espèce ont été conservés en pot individuel tout au long du cycle de production. N'ayant plus l'opportunité d'utiliser les mini ruches de l'an dernier, nous avons opté pour l'hybridation manuelle des cotonniers. Le pollen a été récolté dès l'ouverture des fleurs et déposé à deux reprises dans la journée (9h et 11h) sur la même fleur. Pour certaines fleurs, la castration a été opérée la veille de l'anthèse en enlevant la colonne staminale.

Le programme comportait plusieurs types d'hybridation qui tenaient compte du sens du croisement et de la présence (ou absence) d'autopollen dans la fleur femelle :

- croisements *G. hirsutum* x *G. herbaceum* (sans castration) ;
- croisements *G. hirsutum* x *G. herbaceum* (avec castration) ;
- croisements *G. herbaceum* x *G. hirsutum* (sans castration) ;
- croisements *G. herbaceum* x *G. hirsutum* (avec castration).

Les croisements sans castration ont été les plus nombreux sachant que, dans la nature, l'autopollen est présent et que la tentative de croisement en serre en 2003-2004 reposait sur la seule activité des abeilles mises en cage.

Les plants ont été divisés en deux groupes selon qu'elles étaient destinées à la production de pollen pour la fécondation (donneurs) ou à la production de capsules hybrides (receveurs). En fin de période estivale (avril), la libération de pollen a sensiblement décliné. Suspectant les conditions hygrométriques de la serre, une partie des plants de *G. hirsutum* et de *G. herbaceum* ont été déplacés à l'extérieur sous un filet protecteur. Les opérations de récolte de pollen et de croisement se sont poursuivies sur les deux fronts.

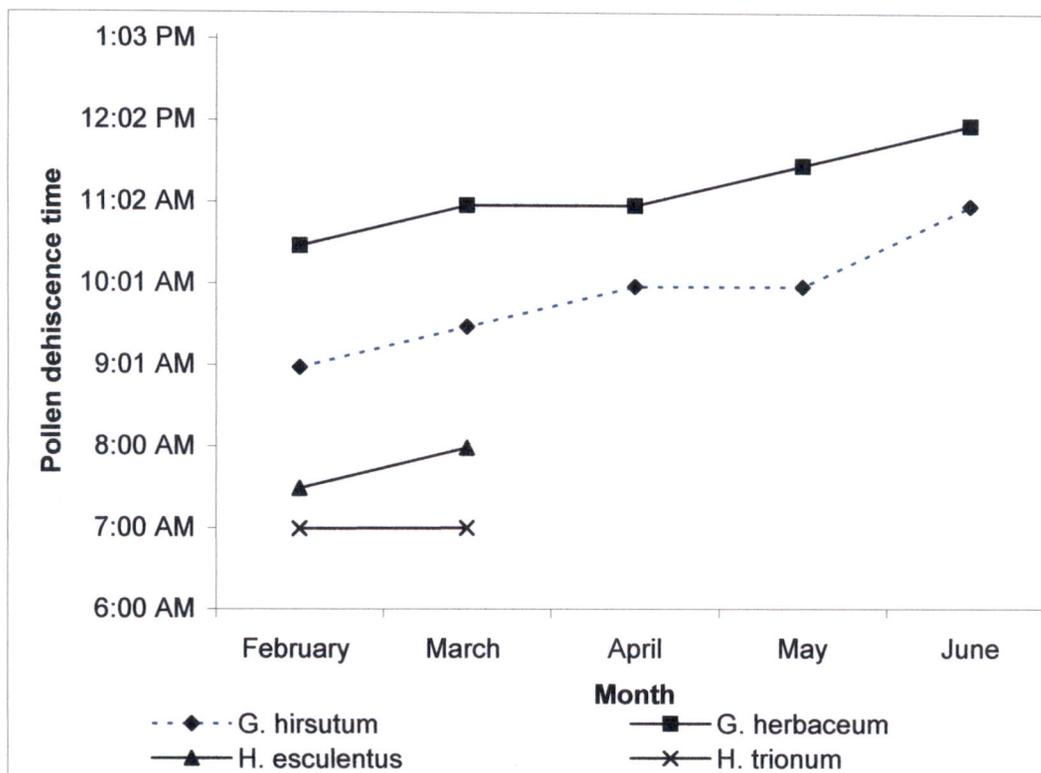
Parallèlement à l'hybridation entre *Gossypium* sp., l'essai a été étendu à *Hibiscus trionum* et *Abelmoschus esculentus*.

Résultats

1. Comportement des espèces entrant dans les croisements

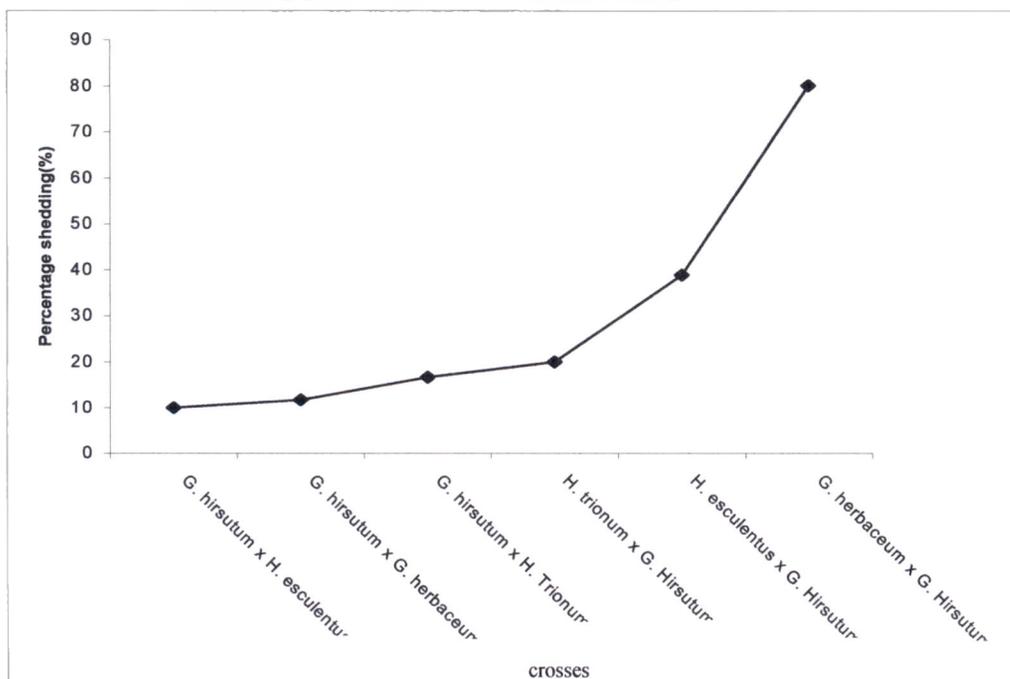
La maturité du pollen, concrétisée ici par la faculté de déhiscence des anthères, est retardée au fur et à mesure que l'on se rapproche des conditions hivernales (faibles températures et faible taux d'humidité de l'air). Cette évolution est décrite en figure 1-5 et concerne toutes les espèces utilisées dans les croisements à l'exception de *Hibiscus trionum*.

Figure 1-5 : Evolution de l'heure de déhiscence maximale du pollen de 4 *Malvaceae* en serre



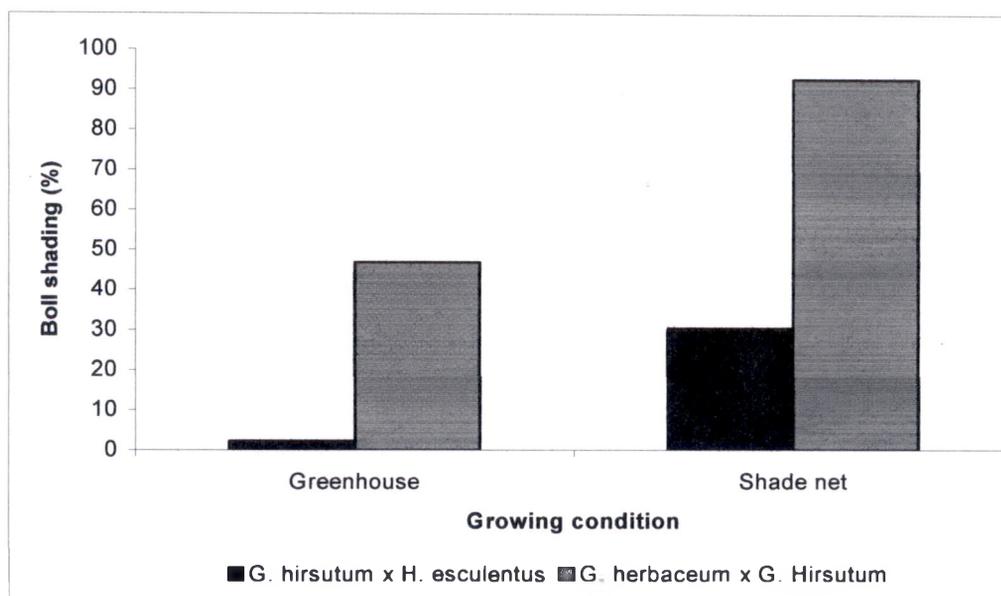
La capacité de rétention de capsules a fortement varié en fonction de la nature du croisement (Fig 1-6). D'importantes pertes de capsule ont été observées dans les croisements entre *A. esculentus* et *G. herbaceum* utilisés comme parent femelle et *G. hirsutum* utilisé comme parent mâle.

Figure 1-6 : Taux de shedding pour 6 croisements avec *G. hirsutum*



Le taux de shedding a été plus important à l'extérieur sous filet que dans la serre (Figure 1-7).

Figure 1-7 : Taux de shedding en serre et sous filet protecteur



2. Produit des hybridations

Le détail des poids et nombres de graines issues des hybridations sont présentés au tableau 1-6. Comme dans le cas des semences récoltées sur les cotonniers sauvages à Makhathini, ces graines seront mises à germer en casier et les plantules qui en résulteront seront envoyées à l'analyse de cytométrie de flux afin de détecter d'éventuelles hybridations interspécifiques.

Tableau 1-6 : Détail des récoltes des croisements en serre entre *G. hirsutum* et des Malvacées sauvages.

Croisement	Nombre capsules	Nombre graines	Masse tot (g)	Nombre graines vides	Masse graines vides	% graines vides
G. Hirsutum X Okra	9	293	30.03	0	0	0
G. Herbaceum X G. Hirsutum	30	498	31.85	163	3.72	32.73%
G. Hirsutum X H. Trionum	25	848	82.43	0	0	0
G. Herbaceum "pure"	16	317	25.15	54	1.19	17.03%
G. Hirsutum X G. Herbaceum	60	1685	167.65	0	0	0

Références

- Amin, K.C. 1940.** Interspecific hybridization between Asiatic and New World Cottons. Ind. J. Agr. Sci. 10:404-413.
- Beasley J.O. 1942.** Meiotic chromosome behaviour in species, species hybrids, haploids and induced polyploids of *Gossypium*. Genetics, 27:25-54.
- Brown M.S. 1947.** A case of spontaneous reduction of chromosome number in somatic tissue of cotton. Amer. J. Bot. 34: 384-388.
- Brown, M.S. 1951.** The spontaneous occurrence of amphidiploidy in species hybrids of *Gossypium*. Evolution 5: 25-41.
- Brown M.S., Menzel M.Y. 1952.** Polygenomic hybrids in *Gossypium* .I. Cytology of hexaploids, pentaploids and hexaploids combinations. Genetics, 37:242-263.
- Brubaker C.L., Brown, A.H.D., Stewrad J.McD., Kilby, M.J., Grace, J.P., 1999.** Production of fertile hybrid germplasm with diploid Australian *Gossypium* species for cotton improvement. Euphytica 108: 199-213.
- Gestrel D.U. 1956.** Segregation in new allopolyploids of *Gossypium*. I. The R₁ locus in certain New World-Wild American hexaploids. Genetics, 41:31-44.
- Gestrel D.U, Phillips. 1958.** Segregation of synthetic amphiploids in *Gossypium* and *Nicotiana*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 23:225-237.
- Iyengar, N.K. 1945.** Cytological investigations on some of the interspecific hybrids of (American x Asiatic) x American cottons and their progenies. Ind. J. Genet. Plant Breeding 5: 32-45.
- Meyer, V.G. 1973.** A study of reciprocal hybrids between Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and experimental lines cytoplasm from seven other species. Crop Sci. 13: 439-444.
- Meyer, V.G. 1974.** Interspecific cotton breeding. Econ. Bot. 28:56-60.
- Skovsted A. 1933.** Cytological studies in cotton I. The mitosis and meiosis in diploid and triploid Asiatic cottons. Ann. Bot. 47:227-251.
- Skovsted A. 1934.** Cytological studies in cotton II. Two interspecific hybrids between Asiatic and New world cottons. J. Genet. 28:407-424.

CHAPITRE II

Etude des insectes pollinisateurs du cotonnier en Afrique du Sud

Hofs J-L.^a, Pierre J.^b

a Cirad, UPR Système cotonniers, Montpellier.

b Inra, Le Rheu, Rennes.

Les travaux menés en 2004-2005

Une seconde série d'observations entomologiques sur les fleurs de cotonniers a été effectuée dans les trois principales régions de production :

North-West Province (Rustenburg),
Mpumalanga (Marble Hall),
KwaZulu Natal (Makhathini).

Ces observations avaient pour but de :

- réaliser un inventaire des insectes (biodiversité),
- estimer leur abondance
- comparer leur présence sur plants Bt et non-Bt entre le pic de floraison et la capsulaison des cotonniers.

L'étude a été élargie aux fleurs de cotonnier sauvage (*G. herbaceum* var. *africanum*) et d'*Hibiscus* (*H. trionum* et *H. canabibus*) présents dans les zones de culture. Ces opérations étaient destinées à apporter des éléments de réponse sur :

- la présence d'insectes floricoles communs au cotonnier cultivé transgénique et aux autres espèces sauvages ;
- le statut de certains insectes en tant que pollinisateurs spécifiques du cotonnier.
- les différentes aires de répartition des insectes pollinisateurs du cotonnier en Afrique du Sud.

Les travaux menés en 2004-0-2005 ont également comporté des études prenant en compte une partie du rôle des insectes dans les transferts de pollen. Ainsi nous avons effectué des mesures de grain de pollen sur le corps des insectes les plus abondants. Nous avons également cherché à évaluer les capacités de déplacement de l'un d'entre eux qui est très fréquent et qui pourrait être un candidat à la pollinisation entomophile du cotonnier. Il s'agit d'*Astylus atromaculatus* sur lequel il n'existe aucune donnée de cet ordre dans la littérature.

18 AVR. 2006

Bref rappel de la biologie florale et de la pollinisation du cotonnier

Les boutons floraux de cotonnier apparaissent sur les nœuds des ramifications sympodiales (branches fructifères) sous forme de structures pyramidales appelées squares (Demol, 1992). La fleur, de formule E 3-4 (5) C 5 A (100-150) G (3-5), se compose d'un pédoncule plus ou moins long, de trois bractées dentées, d'un calice gamosépale formé de cinq sépales soudés, d'une corolle dialypétale de cinq pétales blanc crème à jaune clair, d'un androcée composé d'au moins 10 rangs d'étamines bilobées formant un cylindre autour du style (colonne staminale) et d'un gynécée présentant un stigmate ayant 3 à 5 lobes soudés.

La première fleur éclôt en moyenne 65 jours après le semis (Munro, 1987) ou environ 20 jours après l'apparition du square. Il s'écoule en moyenne 2 à 3 jours entre l'ouverture de deux fleurs, de même position sur la branche fructifère, situées sur deux sympodes successifs et 6 à 9 jours entre deux fleurs successives sur le même sympode. Ce rythme de floraison peut être influencé par le climat.

La fleur de cotonnier s'ouvre le matin, deux heures après le levé du soleil. La fleur est généralement fécondée par son propre pollen mais la pollinisation peut-être également entomophile (Free, 1993). Vu sa masse importante et à son aspect collant (voir chapitre I) la pollinisation chez le cotonnier n'est absolument pas anémophile.

Après germination du pollen sur le stigmate, les tubes polliniques descendent dans le style et atteignent les ovules après 20 à 30 heures. La fécondation s'achève donc le lendemain de l'apparition de l'anthèse. A cet instant, la corolle rosit et fini par tomber.

La fécondation croisée est fortement influencée par la hauteur du stigmate par rapport au niveau supérieur des anthères. Chez le cotonnier égyptien, *Gossypium barbadense* L., la morphologie de la colonne staminale favoriserait davantage la pollinisation croisée par un meilleur dégagement des anthères autour du stigmate (cas du « sea island »). Par contre, chez *Gossypium hirsutum* L. les anthères sont plus rapprochées du stigmate. Cette configuration est supposée favoriser l'autofécondation (Free, 1993).

Etude des pollinisateurs dans la région de Marble Hall (Mpumalanga)

Matériel et méthode

Dans la zone de Marble Hall-Groblersdal, la totalité des champs de coton sont transgéniques et par conséquent l'observation de l'entomofaune sur cotonnier non-Bt ne peut s'effectuer que sur des cotonniers RoundUp Ready.

Les observations ont été réalisées dans deux exploitations : l'une appartenant à M. Grevits (S 24°59'418 / E 29° 18'723) utilisant la variété Bt NuOpal et l'autre de JW Jakobsohn (S 24°58'639 / E 29°12'594) exploitant le cultivar Opal RR. La dispersion des exploitations agricoles, des champs de coton ainsi que la prédominance du cultivar Bt dans la région n'ont pas permis de disposer de traitements rapprochés dans l'espace. Nous avons dû, pour la réalisation de nos études, nous contenter d'exploitations distantes d'une dizaine de kilomètre.

La parcelle semée en cotonnier Bt avait une superficie de 5 ha et celle plantée en cultivar non-Bt avoisinait 8 ha d'un seul tenant.

En raison de contraintes liées à la disponibilité des exploitants et des encadreurs agricoles, les observations ont été réalisées sur 4 dates au mois de février (le 7, 10, 15 et 24). Les comptages ont été réalisés à quatre périodes de la journée (10h30', 11h30', 12h30' et 13h30').

Les comptages ont été réalisés le long d'un transect, c'est à dire un rang de coton de 10m de long que l'on parcourt d'un pas lent afin de ne pas faire fuir les insectes (les abeilles en particulier). N'ont été comptés que les insectes réellement présents dans les fleurs.

L'identification des espèces ou plus généralement des familles a pu être faite directement, au champ, dans la majorité des cas. Cependant pour certains hyménoptères tels que les Colletidae, les Halictidae et les Megachilidae les individus ont été collectés dans les fleurs, placés individuellement dans des tubes et identifiés au binoculaire à l'université de Pretoria. La reconnaissance a été conduite sur base des ouvrages de Delvare et Aberlenc (1989) et de Scoltz et al (). On a choisi de noter 4 transects respectivement dans le champ Bt et non-Bt dans les secteurs Nord Sud, Est et Ouest. Les bordures ont été évitées. Les périodes de comptages dans le champ Bt étaient presque identiques que dans le champ non Bt. L'ordre de passage dans les transects s'est fait au hasard. Il est également indispensable de compter les fleurs disponibles le jour du comptage d'insectes (ce qui est très facile pour le coton) pour chaque transect considéré car ce nombre influe sur la fréquentation par les insectes.

L'abondance des insectes a donc été exprimée en nombre d'insecte/100 fleurs épanouies (nombre d'insectes sur le transect/ nombre de fleurs épanouies sur le transect * 100) pour ne prendre en compte que l'effet cultivar et non pas la densité de fleur qui y est liée.

L'analyse statistique a été réalisée selon la méthode ANOVA et a pris en compte l'effet transgène, l'effet date et l'effet heure pour chaque catégorie d'insectes.

Résultats

Diversité et abondance des insectes pollinisateurs

Le tableau 2-1 présente la liste des insectes les plus fréquemment observés avec leur fréquence dans les fleurs.

Le Coléoptère *Astylus atromaculatus* est l'insecte le plus répandu dans les fleurs de cotonniers dans la région des Springbok Flats (Marble Hall). La comparaison de l'abondance

entre les plantes Bt et non-Bt indique une différence hautement significative en faveur du cotonnier Bt. Ce résultat doit être interprété avec précaution car, compte tenu de la grande distance qui sépare les deux champs, la différence pourrait plus trouver son explication dans les caractéristiques de l'environnement que dans celles de la variété cultivée.

L'abeille domestique, *Apis mellifera*, se retrouve au rang numéro 2 dans les fréquences d'observations sans préférence marquée pour un cultivar.

Pour les autres familles ou espèces, les fréquences sont, comme il avait été mentionné par Schoeman en 2003-2004, très faibles presque toujours inférieures à 1%. Les Scoliidæ sont parfois abondants mais les moyennes restent faibles dans l'ensemble.

Tableau 2-1 : Abondance (Nombre d'individus par 100 fleurs \pm écart type) et diversité de la faune entomologique dans les fleurs de cotonniers Bt et non-Bt de la région de Marble Hall.

Taxa	Cotonnier Bt Nu Opal	Cotonnier non-Bt Opal RR
<i>Astylus atromaculatus</i>	36.4 \pm 32.78 A	5.1 \pm 5.86 B
<i>Apis mellifera</i>	3.6 \pm 2.76	3.9 \pm 4.54
autres Apidea	0.1 \pm 0.13	0
Eumenidæ	0.1 \pm 0.11	0.1 \pm 0.23
Megachilidæ	0.3 \pm 0.45	0.3 \pm 0.47
Scoliidæ	0.5 \pm 0.69	1.4 \pm 1.31
Halictidæ	0	0.1 \pm 0.26
Colletidæ	0.2 \pm 0.30	0
Sphecidæ	0.3 \pm 0.6	0.4 \pm 0.84
Anthophoridæ	0.1 \pm 0.22	0
Anticidæ	0.1 \pm 0.28	0
Mutilidæ	0.1 \pm 0.16	0
Formicidæ	0.7 \pm 1.31	0
Coccinellidæ	0.8 \pm 1.37	0.1 \pm 0.11
Cetoniidæ (Monkey beetle)	0.7 \pm 0.93	0.2 \pm 0.51
Nitidulidæ	0.2 \pm 0.41	0.4 \pm 0.54
Chrysomelidæ	0.2 \pm 0.41	0
Meloidæ	0.9 \pm 1.40	0
Drosophilidæ	0	0.1 \pm 0.22
Miridæ	0.2 \pm 0.39	0.2 \pm 0.28
Thysanoptera	0	1.4 \pm 2.60
Arachnidæ	0.1 \pm 0.14	0.1 \pm 0.23

Les valeurs présentant des lettres différentes sont significativement différentes au niveau 0.05 (test de Tukey – HSD).

Densité florale

La floraison a été abondante durant les observations. Le nombre moyen de fleurs ouvertes par transect était similaire pour les deux types de culture (18.03 \pm 4.22 et 19.72 \pm 3.46 respectivement pour le cotonnier Bt (Nu Opal) et le cotonnier non-Bt (Opal RR))

Effet de la date sur l'abondance des espèces

Pour la période considérée, la date n'influence pas significativement le nombre d'insectes présents dans le champ et dans les fleurs, à l'exception de deux familles : les Eumenidae et les Nitidulidae. Les individus de la première famille n'ont été observés que durant la première journée de comptage, le 7 février. Ils sont peu abondants : ils atteignent la fréquence de 0.38 ± 0.4 individu pour 100 fleurs. En ce qui concerne les Coléoptères Nitidulidae, ils n'ont pas été vus lors des deux premières journées de comptage. Ils sont apparus aux troisième et quatrième comptages (0.6 ± 0.7 individu pour 100 fleurs).

Effet de l'heure

Tableau 2-2 : Abondance des insectes (Nb insectes/100 fleurs \pm écart type) en fonction de l'heure d'observation.

Taxa	10h 30	11h 30	12h 30	13h 30
<i>A. atromaculatus</i>	19.0 \pm 23.8 AB	47.2 \pm 42.4 A	7.9 \pm 8.6 B	8.9 \pm 11.3 B
<i>A. Mellifera</i>	3.9 \pm 3.3 AB	1.5 \pm 1.9 B	8.1 \pm 5.6 A	1.5 \pm 1.8 B
Eumenidae	0.1 \pm 0.2 AB	0 B	0.3 \pm 0.4 A	0 B
Monkey beetle	1.2 \pm 1.2 A	0.4 \pm 0.5 B	0.2 \pm 0.2 B	0 B
Nitidulidae	0.2 \pm 0.3 B	0.9 \pm 0.9 A	0 B	0 B

Chez certaines espèces ou familles, l'abondance des individus varie significativement en fonction de l'heure (tableau 2-2). Pour *A. atromaculatus*, le plus grand nombre d'individus se rencontrent en milieu de journée à 11h 30 mais décroît ensuite très rapidement, tout comme les Nitidulidae et décroît dès le début de l'après-midi. Chez *A. Mellifera* la plus forte fréquence s'observe en milieu de journée à 12h 30. Au contraire, le Cétoine se rencontre plus souvent en milieu de matinée.

Commentaires

Astylus atromaculatus est bien l'espèce la plus abondante dans les fleurs de cotonniers dans la région de Marble Hall. Elle dépasse de loin les abeilles domestiques dont l'importance n'est pas négligeable.

Compte tenu du biais introduit par la dispersion des champs et la probable interaction avec le milieu, on ne peut pas conclure à un quelconque effet du gène Bt sur l'abondance des principaux insectes floricoles (pollinisateurs et autres).

L'étude de la distribution temporelle des insectes montre qu'il semble y avoir deux cortèges successifs des principaux insectes dans des périodes très brèves entre 11h 30 et 12h30 : le premier est un net pic d'abondance des *Astylus* suivi peu de temps après par un pic d'abondance d'*Apis mellifera*. Une compétition quant à l'occupation des fleurs est un facteur possible de cette succession dans la fréquentation florale.

Etude des pollinisateurs dans la région de Rustenburg

Matériel et méthode

Les observations entomologiques ont été réalisées dans le champ d'essai sur parcelles discontinues destiné à l'étude de dispersion du pollen (chapitre 3). Ce champ expérimental était composé d'une parcelle centrale de 100 m² de cotonnier résistant au Round Up (Delta Pine Opal RR, même cultivar que celui utilisé chez Jacobsonh à Marble Hall) bordée par deux parcelles de 3000 m² de cultivar résistant Bt NuOpal et distantes de 15 mètres par rapport au centre du champ expérimental.

Comparaison de la fréquentation du coton Bt et non Bt par les insectes pollinisateurs :

Les comptages ont été réalisés le long d'un transect, c'est à dire un rang de coton de 10m de long que l'on parcourt d'un pas lent afin de ne pas faire fuir les insectes (les abeilles en particulier). N'ont été comptés que les insectes réellement présents dans les fleurs. On a choisi de noter 4 transects dans la partie Bt et 4 transects dans la partie non-Bt dans les secteurs nord sud est ouest. Les bordures ont été évitées. Les périodes de comptages entre la partie Bt et non Bt étaient très proches dans le temps afin d'éviter toute perturbation climatique entre les deux notations sur chaque type de coton (les abeilles sont capables de disparaître en quelques minutes suite à un passage nuageux). L'ordre de passage dans les transects s'est fait au hasard. Les comptages ont été réalisés à diverses heures de la journée pouvant correspondre à des phases d'activités différentes selon les insectes considérés et à la phase de disponibilité en pollen ou en nectar de la fleur.

Il est également indispensable de compter les fleurs disponibles le jour du comptage d'insectes (ce qui est très facile pour le coton) pour chaque transect considéré. Cette notation est importante car il nous a semblé que la variété Opal RR offrait moins de fleurs, ce qui aurait une incidence directe sur le nombre d'insectes. Ainsi un nombre inférieur d'insectes sur le cotonnier RR pourrait imputer à tort un avantage au transgène Bt si l'on ne prenait pas en compte la densité de fleurs. A contrario, si le coton Bt est plus précoce, on pourrait, en phase de déclin de floraison du non Bt, attribuer à tort un effet plus attractif du coton non-Bt parce qu'il serait encore en fleurs.

Pour ces raisons, les données finales ont été exprimées en nombre d'insectes pour 100 fleurs. Le fichier de données se présentait comme suit (sur Bt ou non Bt) :

Date

Heure

Nb d'insecte selon catégorie (abeille, Astylus etc...) d'où nombre total d'insectes (4 transects))

Nb de fleur dans la journée à la date x (4 transects)

Nb d'insectes selon catégorie calculés pour 100 fleurs ou nombre total d'insectes/ 100fl.

Nombre de répétitions: 6 jours en pleine floraison des deux génotypes (3/02, 17/02, 4/03, 17/03, 1/04, 18/04), à 2 heures différentes (10 et 14 h.). Dans certains cas, on a noté la présence ou l'absence de pelotes de pollen chez certains Hyménoptères Apoïdes.

L'analyse statistique a été réalisée selon la méthode ANOVA et a pris en compte l'effet cultivar, l'effet date et l'effet heure pour chaque catégorie d'insectes.

Résultats

Diversité et abondance des insectes pollinisateurs

Les principaux insectes rencontrés dans les fleurs de cotonnier sont présentés dans le tableau 2-3. Deux espèces et les individus appartenant à plusieurs autres familles sont très fréquents dans les champs de coton à Rustenburg : *Astylus atromaculatus* (Coleoptera :Melyridea), *Apis mellifera*., les Megachilidae, les Halictidae et les Colletidae Cette année, les thrips (Thysanoptera) et les drosophiles (Drosophilidae) ont été également très abondants dans les fleurs.

Les Scoliidae et les Nitidulidae ont été significativement plus abondants dans les fleurs de cotonnier non-Bt. Par contre les Jassides ont été observés dans les fleurs de cotonnier Bt alors qu'aucun d'entre eux n'a été vu dans les fleurs de non-Bt.

Tableau 2-3: Abondance (exprimée en nb ins/100 fleurs \pm écart type) et diversité des principaux groupes d'insectes floricoles du cotonnier à Rustenburg

Taxa	Cotonnier Bt Nu Opal	Cotonnier non-Bt Delta Pine Opal RR
<i>Astylus atromaculatus</i>	102.9 \pm 62.64	94.9 \pm 5.48
<i>Apis mellifera</i>	8.4 \pm 5.28	4.7 \pm 7.05
Megachilidae	12.2 \pm 20.19	3.2 \pm 4.33
Scoliidae	0.2 \pm 0.40 B	1.6 \pm 2.50 A
Halictidae	4.8 \pm 4.27	3.1 \pm 4.22
Colletidae	2.7 \pm 2.27	2.8 \pm 3.81
Braconidae	0.2 \pm 0.50	0
Cetonidae	0	0.6 \pm 1.02
Nitidulidae	1.2 \pm 1.73 B	3.9 \pm 6.48 A
Chrysomelidae	1.3 \pm 1.72	5.1 \pm 5.91
Meloidae	2.8 \pm 2.32	5.4 \pm 7.18
Apionidae	0.3 \pm 0.61	0
Acrididae	0.3 \pm 0.51	0
Jassidae	0.9 \pm 1.51 A	0 B
Drosophilidae	1.6 \pm 2.73	6.0 \pm 10.02
Hemiptera	1.6 \pm 2.66	0.3 \pm 0.66
Thysanoptera	16.5 \pm 23.36	39.5 \pm 57.61
Arachinidae	0.7 \pm 1.13	0

Les valeurs présentant des lettres différentes sont significativement différentes au niveau 0.05 (test de Tukey – HSD).

Densité florale : nombre de fleurs épanouies par transect de 10 m.

Densité florale

A l'instar de la saison dernière, le comptage des fleurs dans les transects a révélé une différence nette dans l'abondance de fleurs des deux géotypes. Le cultivar Delta Pine Opal RR (7.1 ± 1.19) est significativement moins florifère que le cultivar environnant NuOpal (4.3 ± 1.32). Par contre aucune différence significative n'apparaît entre dates. Il apparaît donc que, pendant la période de notation, la floraison était stable pour chaque cultivar mais que ceux-ci avaient une floribondité différente.

Effet de la date sur l'abondance des espèces

Certains taxa ne s'observent en nombres significatifs que pendant une période limitée. Les Thrips et les Nitidulidae sont significativement plus fréquents en fin de saison (tableau 2-4).

Tableau 2-4 : Evolution de la fréquence des insectes (exprimée en : nombre d'insectes par 100 fleurs \pm écart type) en fonction des date d'observation.

Taxa	3/02	17/02	4/03	17/03	1/04	18/04
Thysanoptera	0 B	0 B	0 B	139.7 ± 4.5 A	28.4 ± 70.1 A	0 B
Nitidulidae	0 B	0 B	0 B	13.0 ± 10.3 A	2.1 ± 3.1 A	0 B

Les valeurs présentant des lettres différentes sont significativement différentes au niveau 0.05 (test de Tukey – HSD).

En fin de saison, comme l'année dernière, les drosophiles ont été observées durant de très longues périodes dans le fond des fleurs. Cependant les résultats ne permettent pas de mettre en évidence des différences statistiques entre dates pour la présence précoce d'individus, en faible nombre, en date du 17/2.

Effet de l'heure

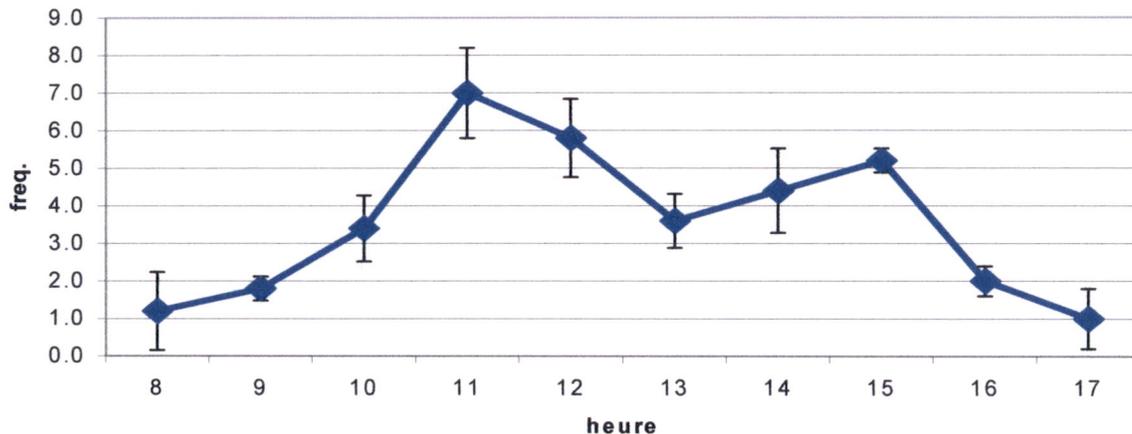
De façon générale, aucun effet n'a été enregistré entre les fréquences d'insectes mesurées en milieu de matinée et celles relevées en milieu d'après-midi.

Dans le cas particulier de *Apis mellifera*, une étude complémentaire a été réalisée indépendamment de l'inventaire faunistique.

Trente fleurs successives sur un transect ont été observées par intervalle de 1 heure tout au long de la journée sur 5 dates. Les abeilles domestiques ont été dénombrées à l'intérieur de chaque fleur.

Les résultats (figure 2-1) indiquent que les abeilles sont peu présentes dans le champ de coton aux premières heures de la journée. La fréquence s'accroît pour atteindre un pic vers 11 h et se relâche peu après. Un second pic est atteint vers 15 h ; puis l'activité chute jusqu'en fin de journée.

Figure 2-1: Taux de visite de *Apis mellifera* dans les fleurs de cotonnier au courant de la journée



Activité comparée d'*Astylus atromaculatus* et d'*Apis mellifera* sur la fleur

Les données montrent que les abeilles domestiques ont une vitesse de visite à la fleur 40 fois plus rapide qu'*A. atromaculatus* (8.32 ± 3.78 contre 0.21 ± 0.98 fleurs/min).

A partir de ces vitesses de butinage et le nombre moyen d'insecte/100 fleurs sur les deux cultivars (tableau 2-3) nous avons estimé un indice de fréquentation en calculant le produit de ces deux paramètres. Pour les *Astylus* cet indice est de 20,8 soit $0,21 \times ((102,9 + 94,9)/2)$ et pour les *Apis mellifera* il est de 54,9 soit $8,32 \times ((8,4 + 4,7)/2)$.

Commentaires sur les résultats obtenus à Rustenburg

Comme à Marble Hall, *Astylus atromaculatus* se trouve en abondance dans les fleurs de cotonnier. Rappelons qu'à Rustenburg et à l'instar de Marble Hall, on cultive du maïs et du tournesol et que ces plantes sont très attractives pour ce coléoptère.

Par ailleurs, la présence des Hyménoptères est non négligeable et bien supérieure aux résultats obtenus en 2003-2004.

La présence de Jassides uniquement sur cotonnier Bt est révélatrice de l'impact de l'adoption du cotonnier transgénique sur les pratiques phytosanitaires. L'introduction du cotonnier Bt peut en effet causer indirectement l'augmentation ou la diminution significative de populations d'insectes non cible. Dans ce cas particulier des Jassides, la protection du cotonnier Bt vis-à-vis de cet insecte par traitement insecticide a été probablement négligée. L'utilisation des pyréthrinoïdes dirigée contre *Helicoverpa armigera* (bollworm) en aurait probablement réduit les populations.

L'abondance de Scoliidæ et de Nitidulidæ sur le cotonnier non-Bt n'est pas explicable à ce stade et nécessiterait une étude plus approfondie.

Les abeilles domestiques sont plus mobiles qu'*A. atromaculatus*. Elles visitent 40 fois plus de fleurs par unité de temps et malgré une moindre abondance, leur indice de fréquentation est plus de deux fois supérieur à celui d'*A. atromaculatus*.

Etude des pollinisateurs dans les Makhathini Flats

Contrairement à l'année précédente pour laquelle les observations avaient été réalisées en milieu paysan, le comptage des insectes a été effectué sur des parcelles de la station expérimentale de Makhathini.

Matériel et méthode

Deux parcelles distantes de 100 mètres ont été utilisées pour mener les comptages. Elles contenaient du cotonnier Bt (NuOpal) et non-Bt (Opal), deux lignées quasi isogéniques.

Les observations ont été réalisées à 4 dates (22 février, 10 mars, 31 mars et 11 avril) dans 4 transects de 10 m de long par champ. Six comptages ont été opérés dans la matinée : 8h, 9h30', 10h, 11h, 1130, 12h.

Les observations ont été réalisées par temps ensoleillé ou légèrement couvert. Les données ont été analysées suivant une ANOVA.

Il n'a pas été possible de réaliser des comptages de passages entre les deux différentes cultures car les champs paysans étaient trop distants les uns des autres.

Résultats

Diversité et abondance des insectes pollinisateurs (tableau 2-5)

Tableau 2-5 : Abondance (exprimée en nbre d'insectes/100 fleurs \pm écart type) et diversité des principaux groupes d'insectes floricoles du cotonnier à Makhathini

Taxa	Cotonnier Bt	Cotonnier non-Bt
<i>Apis mellifera</i>	13.7 \pm 4.3 B	16.3 \pm 6.0 A
Apidae sauvages	0.6 \pm 0.62	1.4 \pm 1.1
Megachilidae	2.3 \pm 1.54	1.0 \pm 1.21
Scoliidae	1.1 \pm 0.74	1.8 \pm 1.2
Halictidae	3.1 \pm 1.80	4.3 \pm 2.47
Colletidae	0.3 \pm 0.41	2.0 \pm 2.33
Sphecidae	0.9 \pm 0.63	1.2 \pm 1.23
Formicidae	2.2 \pm 1.57	2.8 \pm 2.18
Nitidulidae	39.9 \pm 35.48	47.6 \pm 30.65
<i>Mylabris oculata</i> (CMR)	2.8 \pm 1.08	5.1 \pm 2.62
Meloidae autre que CMR	5.6 \pm 4.73	9.0 \pm 8.16
Drosophilidae	34.3 \pm 31.75	53.6 \pm 59.44
Asilidae	2.5 \pm 0.1	3.6 \pm 2.11
Papilionidae	2.8 \pm 0.01	0

Les valeurs présentant des lettres différentes sont significativement différentes au niveau 0.05 (test de Tukey – HSD).

Les Nitidulidae et les Drosophilidae se rencontrent en grand nombre dans les fleurs de cotonnier. *Apis mellifera* est fréquemment observée et les données collectées à Makhathini indiquent que leur nombre est significativement plus abondant sur le cotonnier non-Bt.

Densité florale

Les comptages ont été effectués en phase de production florale descendante (entre le 22 fev et le 11 avril). La variété NuOpal présente en moyenne significativement plus de fleurs que les variétés Opal RR , de même fonds génétique (15.6 ± 4.68 vs 11.5 ± 4.25 respectivement pour NuOpal et Opal RR)..

Effet de la date sur l'abondance des espèces

Parmi les principaux taxa observés, quatre d'entre eux (tableau 2-6) présentent des fréquences significativement différentes au cours du temps.

Tableau 2-6: Abondance (nombre d'insectes par 100 fleurs \pm écart type) des insectes en fonction de la date d'observation.

Taxa	22/02	10/03	31/03	11/04
<i>A. Mellifera</i>	12.5 \pm 3.8 B	14.1 \pm 4.8 AB	15.6 \pm 4.7 AB	17.8 \pm 5.8 A
<i>Milabrys oculata</i>	4.0 \pm 1.4	2.7 \pm 2.1	2.6 \pm 0.5	5.3 \pm 1.9
Meloidae	2.2 \pm 1.1 B	2.3 \pm 2.02 B	3.3 \pm 1.78 B	16.8 \pm 9.00 A
Drosophilidae	2.9 \pm 1.20 B	3.5 \pm 4.45 B	42.9 \pm 28.27 B	96.3 \pm 60.71 A
Nitidulidae	0.3 \pm 1.07 B	0 B	61.9 \pm 34.55 B	74.3 \pm 19.36 A

Les valeurs présentant des lettres différentes sont significativement différentes au niveau 0.05 (test de Tukey – HSD).

En général, les fréquences observées pour les insectes listés dans le tableau 2-6 augmentent avec le temps. Contrairement à *M. oculata* dont les effectifs restent stables au cours du temps, les autres espèces de Meloidae, de taille plus réduite, augmentent progressivement au courant de la campagne. Il en est de même pour les Drosophilidae et les Nitidulidae ; à mesure que la floraison décroît.

L'évolution des effectifs (figures 2-2 et 2-3) de *Apis mellifera*, des Drosophilidae et des Nitidulidae est négativement (et significativement) corrélée à la réduction de la floribondité (avec respectivement $r = -0.978$, -0.975 , -0.975 pour $\alpha = 0.05$). Les effectifs de *M. oculata* et des Meloidae ne sont par contre pas significativement corrélés à l'évolution de la floraison (avec respectivement $r = -0.479$ et -0.838 pour $\alpha = 0.05$). A l'exception de *A. mellifera* et de *M. oculata*, cette augmentation de l'abondance des individus dans les fleurs en fin de campagne ne réside pas uniquement dans la réduction du nombre de fleurs à visiter. En effet, l'augmentation des effectifs des Meloidae, des Drosophilidae et des Nitidulidae est plus que proportionnelle à la diminution du nombre de fleurs et par conséquent découle d'une réelle pullulation d'insectes.

Figure 2-2 : Evolution des effectifs de *Apis mellifera*, *Milabris oculata* et de Meloidae en fonction de l'abondance de la floraison à Makhathini (2005).

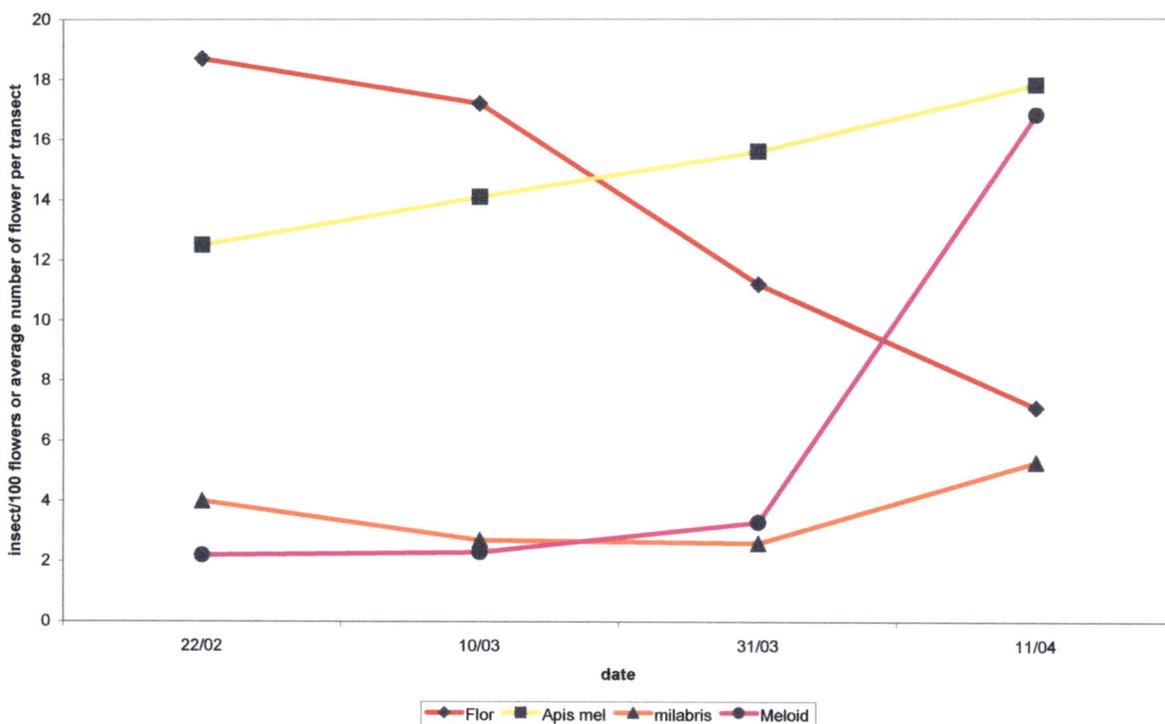
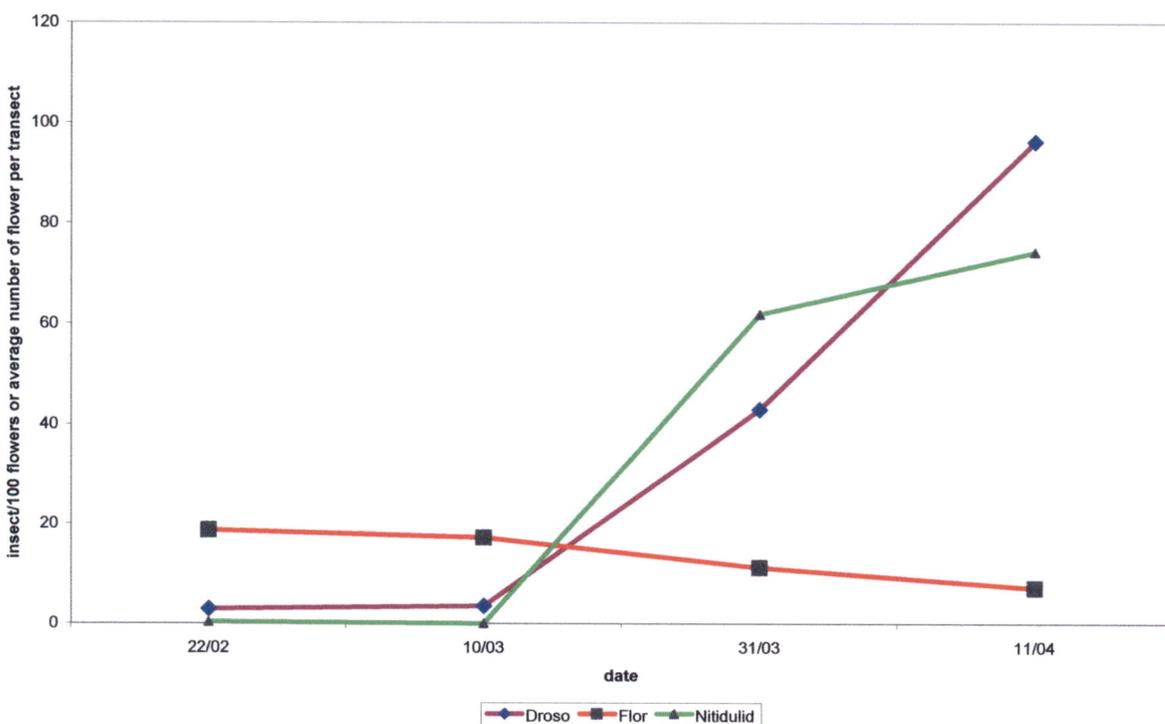


Figure 2-3 : Evolution des effectifs de Drosophilidae et de Nitidulidae en fonction de l'abondance de la floraison à Makhathini (2005).



Effet de l'heure

Les fréquences de certains taxa fluctuent significativement dans le courant de la matinée. C'est le cas des abeilles domestiques, de *M. oculata*, de Sphecidae et de Nitidulidae. La figure 2-4 donne l'évolution des fréquences pour *A. mellifera* et les Sphecidae, prédateurs de l'abeille. Les courbes montrent que le moment où les abeilles sont le plus nombreuses (11h) correspond au pic de présence des Sphecidae.

Dan le cas de *M. oculata* et des Nitidulidae, les variations observées en fonction de l'heure (tableau 2-7) n'ont pas trouvé d'explication à ce stade d l'étude.

Figure 2-4: évolution de la fréquence de *Apis mellifera* et des *Sphecidae* au cours de la matinée.

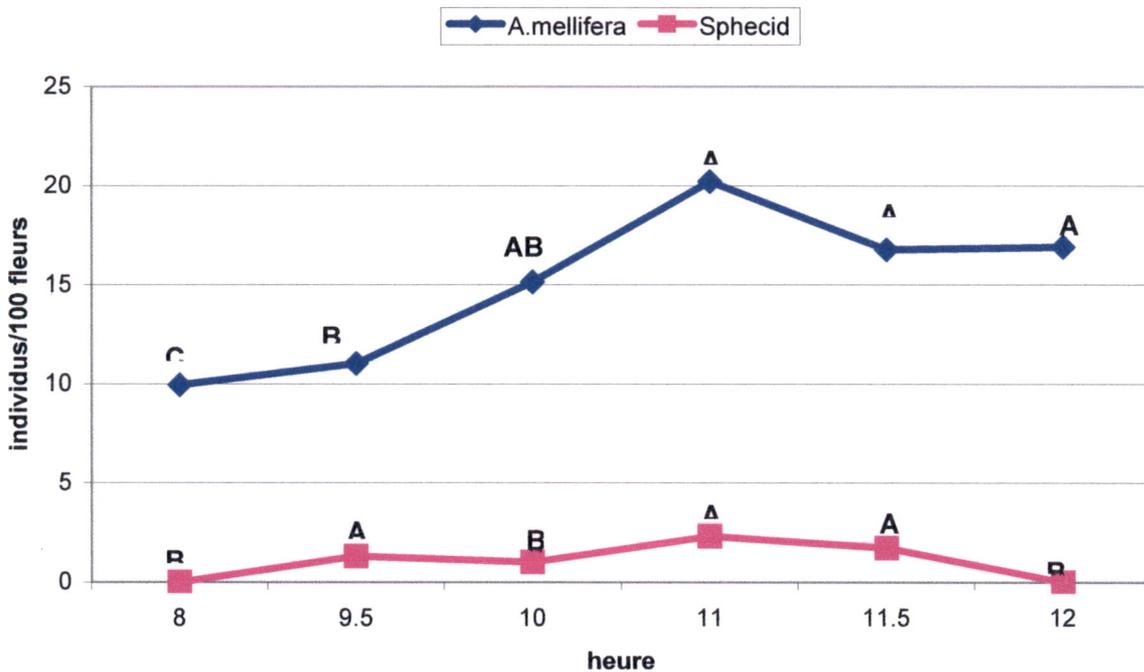


Tableau 2-7 :Evolution de l'abondance des insectes (nombre d'insectes par 100 fleurs ± écart type) en fonction de l'heure de la matinée.

Taxa	8h00	9h30	10h00	11h00	11h30	12h00
<i>M. oculata</i>	4.5 ± 1.47 A	3.5± 1.73 AB	3.8±1.59 A	2.7± 1.83 AB	3.0±2.25 AB	1.4±0.92 B
Nitidulidae	0 B	74.2±19.36 A	14.9± 11.57 B	41.1 ±38.52 A	0 B	0 B

Les valeurs présentant des lettres différentes sont significativement différentes au niveau 0.05 (test de Tukey – HSD).

Commentaires sur les résultats obtenus à Makhathini

Comme l'an dernier, aucun spécimen d'*Astylus atromaculatus* n'a été recensé dans les champs de coton de la région des Makhathini Flats, bien que cette zone soit incluse dans son aire de distribution (Picker et al.2003). Ce dernier point devrait faire l'objet d'une étude approfondie afin de vérifier si l'espèce est réellement ubiquiste dans la province du KwaZulu Natal. Cinq années d'observation de la faune entomologique dans les champs de cotonniers dans ces régions n'ont jamais révélé la présence de cet insecte (Hofs et al. 2005). La zone agricole de Pongola est à prédominance cannière et cotonnière et les Makhathini Flats ne comportent presque pas de culture de maïs. Il est dès lors très probable que *A. atromaculatus* ne se rencontre que dans des zones de culture de maïs ou de tournesol.

Les abeilles sont abondamment présentes dans les champs et proviennent de colonies sauvages logées dans la brousse. Les petits Hyménoptères ont été beaucoup plus fréquents qu'en 2003-2004. Les Meloidea qui se nourrissent du pollen et des pétales semblent occuper la niche d'*Astylus*. Bien qu'ils soient moins nombreux, ils sont plus voraces et ont certainement un effet plus destructeur que *Astylus*.

Etude partielle de la capacité de transport de pollen chez les principaux insectes rencontrés dans les fleurs de cotonniers

Les insectes floricoles n'ont pas le même comportement visiteur ou butineur, voire la même morphologie. Pour un insecte donné, sa qualité de vecteur de pollinisation dépend, entre autre, de la quantité de pollen capable d'adhérer sur son corps. Le but de notre étude est de quantifier les grains de pollen sur des insectes capturés dans les fleurs de cotonnier afin d'évaluer leur capacité de transport.

Cependant, il faut souligner que cette étude ne peut refléter que partiellement les transferts réellement effectués. Il faudrait en effet prendre en compte la décharge en pollen effectuée sur le stigmate de la plante (dépôt pollinique) pour connaître l'intensité pollinisatrice des insectes visitant les fleurs de cotonnier.

Matériel et méthodes

Douze familles ou espèces ont été choisies parmi les insectes les plus abondants dans les fleurs de cotonnier (tableau 2-8). Dix individus de chaque taxon ont été prélevés par sites d'étude (Rustenburg, Marble Hall et Makhathini), portant l'effectif total entre 10 et 30 individus selon les taxons présents dans les localités. Les insectes ont été collectés individuellement dans des tubes et immédiatement tués afin d'éviter qu'ils n'ingèrent ou détruisent des grains de pollen.

Au laboratoire, chaque insecte a été observé au binoculaire sous un grossissement de 10 ou 20 x. Le nombre de grains de pollen retenus sur l'insecte a été estimé par comptage, au moyen d'un compteur à main, sur l'une des moitiés latérales du spécimen.

Tableau 2-8 : Nombre d'observations réalisée dans le cadre de l'estimation de la charge en pollen de 12 familles ou espèces d'insectes visiteurs des fleurs de cotonnier.

insecte	<i>Astylus</i>	<i>Apis</i>	Thrips	Mega-chilidae	Scoli-idae	Colle-tidae	Droso-philidae	Jassidae	Chryso-melidae	Meloidae	Nitidulidae	Anto-phoridae
n . sites	2	3	2	3	3	3	3	1	1	3	3	1
individus	20	30	20	30	30	30	30	10	10	30	30	10

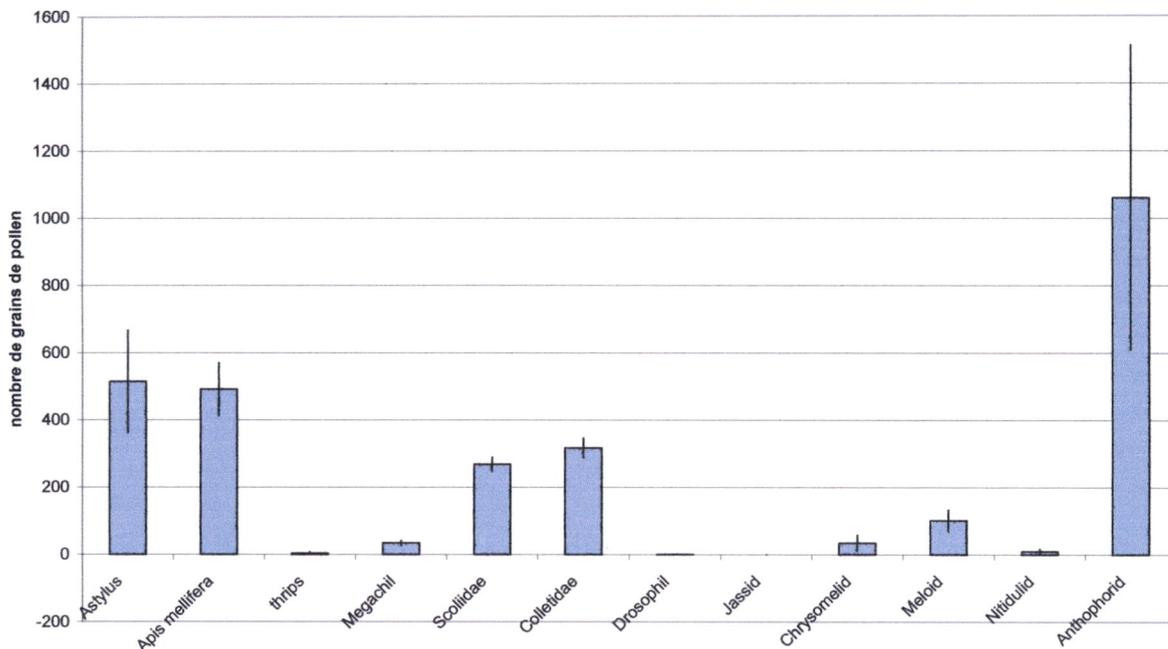
Résultats

Aucune différence n'est à signaler en ce qui concerne les quantités de pollen trouvées sur des individus prélevés dans des sites différents

Par contre, il existe de grandes différences entre familles ou espèces (figure 2-5). Les Hyménoptères sont généralement fortement couverts de grains, notamment les Anthophoridae. *Astylus* a également une capacité de transport non négligeable et comparable à celle des abeilles. Le pollen est trouvé en plus faibles quantités sur les Meloidae. Les coléoptères Nitidulidae parfois présents en grand nombre dans une fleur n'ont qu'une capacité de charge réduite à quelques grains. D'autres comme les thrips et les drosophiles ne sont chargés que d'un ou deux grains et la charge est nulle chez les Jassides. Les observations réalisées lors de ces comptages indiquent que le nombre de grains de pollen adhérent sur le corps d'un insecte dépend principalement de la densité de soies ou de poils et de sa taille.

Figure 2-5 : Charge pollinique moyenne sur le corps des insectes capturés dans les fleurs de cotonnier (moyenne de 1 à 3 sites selon le taxon)

Figure: Charge de pollen chez les insectes floricoles du cotonnier en RSA



Commentaires

Il est possible de classer les insectes selon leur capacité à se charger de pollen par des techniques simples mais coûteuse en temps.

Parmi les insectes ayant la plus forte charge on retrouve les Hyménoptères Apidés : Anthophoridae, Abeille domestique, Colletidae par ordre d'importance. Ce sont des insectes connus comme pollinisateurs. Mais la forte charge de l'Astylus voire d'Hyménoptères Scoliidæ mérite d'être soulignée car elle est moins connue.

En effet, peu de données existent sur ce sujet dans la littérature scientifique. Ce type de recherche est utile non seulement dans les domaines de l'évaluation des risques liés à l'introduction de plantes transgéniques mais aussi dans la multiplication semencière. Cette information peut être utilisée dans l'élaboration de modèles de dispersion et d'estimation du flux de gène dans une région donnée à partir de la connaissance des principaux pollinisateurs.

Distance de vol d'un insecte pollinisateur

La connaissance de la capacité de charge en pollen n'est qu'un élément dans la détermination du risque de dispersion chez les plantes à pollinisation entomophile.. Il importe aussi de connaître la distance que peut parcourir l'insecte qui larguera éventuellement le pollen dont il est chargé. De nombreuses études ont été réalisées sur les abeilles domestiques mais il existe très peu de littérature sur les espèces sauvages. Nous avons choisi *Astylus atromaculatus* pour cet essai puisqu'il est un des principaux insectes rencontré dans les champs de coton du highveld et qu'il est peu connu.

Matériel et méthode

L'étude a été menée dans un champ d'essai de dispersion en population homogène à Rustenburg (voir chapitre III). Au préalable, cent *Astylus* ont été récoltés sur des plants de tournesol et mis dans un conteneur en plastique. Ils ont été teints au moyen de bleu de méthylène en poudre et ensuite légèrement mouillés. Les individus colorés en bleu ont été déposés sur les fleurs du tiers supérieur d'une plante de cotonnier située au milieu du champ de 1 ha (100 m x 100 m).

Le repérage des insectes colorés a été réalisé par des étudiants parcourant des bandes concentriques et rayonnantes par rapport aux quatre points cardinaux, à des distances par rapport au centre de 0 -1 m, 1-5 m, 5-10m, 15-20 m, 25 m, 50 m, 100 m, 125 m et 150 m Elles se sont répétées selon les pas de temps suivants : 5 min, 15 min, 30 min, 1h, 2 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h et 72 h.

Cet essai a été réalisé à deux reprises les 4 et 18 mars.

Résultats

Le marquage des insectes au bleu de méthylène ne semble pas avoir significativement perturbé leur comportement. Les résultats de l'étude des déplacements sont présentés sous forme de graphiques 3D (figures 2-4 et 2-5) et dans les tableaux 2-9.

La zone du lâché d'insectes (rayon central de 1m) se vide plus ou moins rapidement selon l'essai. Le nombre d'individus décroît plus vite et la dispersion est plus rapide lors du second essai. En moyenne les individus restent confinés dans ces 25 premiers mètres. Au-delà de 25 mètres, c'est-à-dire sur le rayon de 50 m, il est difficile de localiser les individus en raison du dépassement des limites du champ. Néanmoins, il arrive qu'occasionnellement il en soit retrouvé au-delà de cette distance. La présence d'individus a été noté dans deux essais à 150 m du point central 2 heures et 48 heures après le lâcher. Ces insectes ont été retrouvés sur un peuplement d'*Euphorbia heterophylla* parmi d'autres individus de la même espèce.

L'expérience acquise sur le terrain montre que *A atromaculatus* est un insecte capable de se déplacer, poussé par le vent, avec ou sans arrêt (observation personnelle), sur une distance supérieure à 100 mètres. L'importance du vent dans le déplacement du Coléoptère apparaît à l'examen de la position des lieux de recapture qui se situent pour les moyennes et longues distances dans le secteur sous le vent.

Figure 2-6 : Etude des vols de déplacements d'*Astylus atromaculatus* en fonction du délai entre lâcher et arrivée et en fonction de la distance. Rustenburg, 4 mars 2005

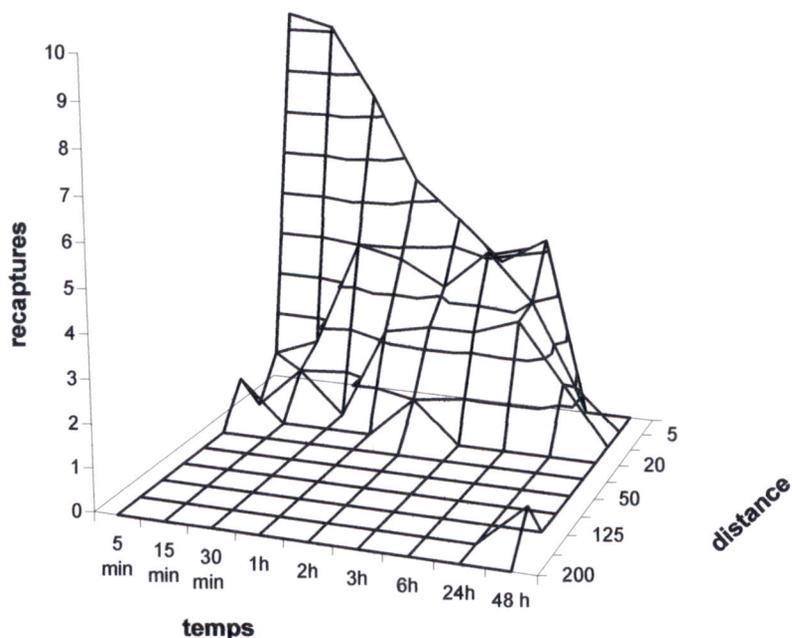


Figure 2-7 : Etude des vols de déplacements d'*Astylus atromaculatus* en fonction du délai entre lâcher et arrivée et en fonction de la distance. Rustenburg, 18 mars 2005

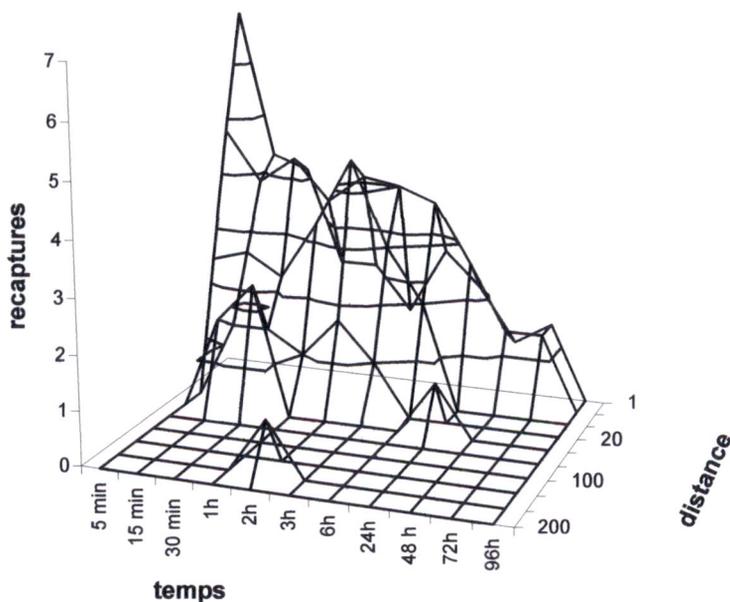


Tableau 2-9: Taux moyens de recapture d' *Astylus atromaculatus* en fonction de la distance du point de lâcher et du temps. Rustenburg 4 et 18 mars 2005.

distance (m)	4/03	18/03	moyenne	% de recaptures sous le vent (secteur Sud, SO)	temps	4/03	18/03	moyenne
1	30.9	10.8	20.9	45	5 min	10.0	8.6	9.3
5	7.0	12.8	9.9	41	15 min	9.6	5.0	7.3
10	2.8	6.3	4.6	61	30 min	8.0	5.3	6.7
20	0.2	0.9	0.6	78	1 h.	5.4	3.3	4.4
25	0	1.0	0.5	80	2 h.	4.2	5.2	4.7
50	0	0	0	-	3 h.	4.0	3.1	3.6
100	0	0	0	-	6 h.	3.9	2.8	3.4
125	0	0	0	-	24 h.	0.3	1.3	0.8
150	0.1	0.1	0.1	100	48 h.	0.1	0.3	0.2
				-	72 h.	0	0.4	0.2

Commentaires

Dans notre situation expérimentale où les limites du champ se situaient à 50m du lieu du lâcher, nous avons observé une tendance de la population d'*Astylus* marqués à rester dans une zone de 25m. Les déplacements sur des distances plus grandes n'ont été que rares (% à donner) mais il faut signaler que, pour cet insecte, voler au dessus d'une discontinuité des terrain (champ cultivé –friche) n'est pas impossible.

Ce type d'essai demande du personnel : on peut compter sur 2 personnes par cercle (ou carré) concentrique. Les résultats sont entachés d'imprécision car malgré toute l'attention portée au repérage, une grande proportion d'individu « se perd » tout au long de l'essai. Il est cependant important de souligner que l'objectif de cette expérimentation reste limité. Il s'agit d'arriver à estimer la distance pouvant être le plus fréquemment parcourue par un individu et non de savoir si tous sont capables de couvrir un rayon donné. Enfin les résultats obtenus sont sans doute dépendants de la taille et de la forme de la parcelle considérée.

Les principaux insectes visiteurs de *Gossypium* et *Hibiscus* sauvages en Afrique du Sud

Pour qu'il y ait dépôt de grains de pollen de *G.hirsutum* sur le stigmate de la fleur de *G.herbaceum*, il faut que les deux espèces soient visitées par le même individu. Il faut donc s'assurer au minimum que les 2 espèces végétales soient susceptibles d'être visitées par une même espèce d'insecte. Nous avons inventorié les insectes visiteurs sur un échantillon de plantes sauvages appartenant aux Malvacées dans leur milieu naturel à proximité des champs de cotonniers cultivés.

Matériel et méthode

Trois espèces ont été étudiées : *G.herbaceum*, *H.trionum* et *H. cannabinus*.

La majorité des observations ont été réalisées sur les Makhathini Flats, zone dans laquelle *G.herbaceum* est le plus abondant. Afin de compléter les données concernant *A.atromaculatus*, l'étude a été étendue sur des plants de *H. trionum* dans la zone de Rustenburg (les espèces *G.herbaceum* et *H. cannabinus* ne faisant pas partie de la zone considérée).

Dans le cas des espèces sauvages, l'inventaire des insectes est conduit différemment de celui réalisé dans un champ homogène. Les plantes sauvages sont généralement peu nombreuses et dispersées. Il est donc impossible de procéder par transects ou examiner dans un court laps de temps une série de fleurs représentant une répétition. Ici les données sont individuelles ; il ne s'agit pas de moyennes. Etant donné le nombre restreint de fleurs et la faible fréquence de visite en comparaison avec la situation en champ, le temps d'observation par fleur est relativement long et de l'ordre de 3 minutes.

Résultats

Le tableau 2-10 indique clairement que les deux principaux insectes visiteurs (et pollinisateurs) du cotonnier cultivé à savoir *Astylus* et *Apis mellifera* n'ont pas été observés sur *G. herbaceum*. Il n'en reste pas moins que des insectes d'importance secondaire soient communs aux deux espèces végétales : des Apoidae sauvages tels que des Anthophoridae et des Megachilidae, mais aussi d'autres familles comme les Formicidae, Meloidae, Nitidulidae, Asilidae et Arachnidae.

Signalons qu'*Astylus atromaculatus* a été observé sur quelques fleurs de *Hibiscus trionum* aux abords des champs d'essai de la station ARC de Rustenburg.

Les arachnides sont présents dans les fleurs des quatre espèces mais représentent un faible risque de transporter du pollen d'une plante à l'autre. Il faut noter par ailleurs que les fourmis sont abondantes sur les plantes trouvées en brousse. Elles visitent les fleurs sans toutefois se charger de quantité significatives de pollen.

Tableau 2-10: comparaison de l'abondance des insectes floricoles (nombre d'insectes par 100 fleurs \pm écart type).chez quatre espèces de Malvacea.

Principaux taxa	<i>G. herbaceum</i>	<i>G. hirsutum</i> (présence)	<i>H. trionum</i>	<i>H. cannabinus</i>
<i>Apis mellifera</i>	0	X	0	3.1 \pm 3.7
autres <i>Apidae</i>	5.0 \pm 9.0	X	5.8 \pm 7.8	5.8 \pm 7.2
<i>Halictidae</i>	0	X	3.3 \pm 5.6	5.3 \pm 5.4
<i>Anthophoridae</i>	5.0 \pm 9.0	X	0	0.5 \pm 0.8
<i>Megachilidae</i>	8.3 \pm 13.3	X	0	6.4 \pm 6.8
<i>Formicidae</i>	53.0 \pm 47.5	X	33.9 \pm 38.5	242.8 \pm 150.6
<i>Vespidae</i>	13.3 \pm 18.3		14.4 \pm 19.3	2.4 \pm 3.8
<i>Astylus</i>	0	X	3.5 \pm 3.1	0
<i>Meloidae</i>	3.3 \pm 6.0	X	1.7 \pm 2.8	27.7 \pm 32.1
<i>Nitidulidae</i>	96 \pm 103.2	X	19.2 \pm 25.6	91.1 \pm 91.1
<i>Lycidae</i>	0		0	1.0 \pm 1.5
<i>Drosophilidae</i>	0	X	0	36.3 \pm 30.4
<i>Bombyliidae</i>	10.3 \pm 14.5		0	0
<i>Syrphidae</i>	20.0 \pm 28.0		0	0
<i>Asilidae</i>	12.0 \pm 16.8	X	0	0
<i>Mucidae</i>	0		0	0
<i>Arachnidae</i>	5.8 \pm 9.3	X	24.3 \pm 16.2	2.7 \pm 3.7

Commentaires

G. herbaceum semble peu attractif pour les abeilles domestiques. Cette particularité réside peut-être dans la morphologie florale et plus particulièrement dans le positionnement et la présence de nectaires floraux. En effet, *G. hirsutum* présente quatre groupes de nectaires floraux (Free, 1993) contre deux chez *G. herbaceum* (Valicek). Chez *G. hirsutum* les plus importants se situent dans le calice (nectaires floraux), deux groupes se trouvent au niveau de l'involucre de bractées et le pédoncule floral peut en être également pourvu (nectaires extrafloraux). Chez *G. herbaceum* le calice présente deux types de nectaires mais les nectaires de l'involucre de bractées sont absents.

La présence de la macule rouge chez l'espèce sauvage *G. herbaceum* ne semble pas exercer une attraction sur les abeilles domestiques. Les taux de visite sont nettement moins importants chez l'espèce sauvage de cotonnier comme Stephens et Finkner (1953) l'avaient noté avec *G. arboreum*.

Discussion générale et conclusions de l'étude entomologique

Les insectes pollinisateurs potentiels du cotonnier

Notre étude sur la biodiversité et l'abondance des insectes présents sur les fleurs de cotonnier *Gossypium hirsutum* en Afrique du Sud confirme des observations effectuées dans diverses régions du globe, Inde et Pakistan (Sidhu et Singh, 1961), USA (respectivement en Arizona et au Texas Moffet et al., 1976, 1979 et Moffet et al., 1977, 1980). En effet, cette fleur est également visitée par un grand nombre d'espèces très différentes dans les sites que nous avons étudiés (dire le nombre d'ordre et de familles). Ceci peut être attribué à sa valeur attractive : elle fournit à la fois du pollen et du nectar aussi bien floral qu'extra floral (Moffett et al., 1976b) et par sa taille relativement grande et sa forme évasée permet chez certains génotypes (mais pas tous) un accès assez facile à ces ressources..

Malgré les difficultés inhérentes à la constitution d'un inventaire (exhaustivité, regroupement des données en taxons de rang différents), le principal point commun entre nos résultats et ceux des autres auteurs précités réside dans la présence importante d'Hyménoptères Apidés 22% à Makhathini, en absence d'*Astylus* et 4 à 11 % dans les autres régions).

Apis mellifera est plus abondante à Marble Hall (11.9% des visiteurs) qu'à Rustenburg (4% des visiteurs). Cette différence pourrait être corrélée à une plus grande abondance d'espèces de plantes cultivées (coton, tabac, Citrus, productions horticoles, vigne...) dans la zone choisie pour l'étude à Marble Hall.

Les Hyménoptères au sens large sont les insectes visiteurs prédominants (42%) dans la région des Makhathini Flats et ce sont des insectes fréquents (derrière *A. atromaculatus*) dans les régions de Rustenburg et de Marble Hall.

Comparés aux autres données de la littérature, nos résultats se caractérisent par la prédominance du coléoptère Melyridae *Astylus atromaculatus* dont nous avons déjà enregistré l'importance lors de l'inventaire de l'année précédente. De plus, en Afrique du Sud, les Hyménoptères Apidés *Megachilidae*, bien que peu ou pas cités dans la littérature, sont relativement fréquents dans certaines régions (KwaZulu Natal et Nord-West). La littérature scientifique américaine fait plutôt mention des Hyménoptères Apidés Anthophoridae, genre *Xylocopa* (Kevan et Baker 1983, Waller et al. 1985) mais ces insectes ne semblent pas être d'importants visiteurs de fleur de cotonniers cultivés dans nos essais. Par contre, leur présence est significative sur le cotonnier sauvage dans le KwaZulu Natal. A noter également que *Mylabris oculata* et d'autres espèces de Meloidae se rencontrent dans les fleurs de cotonnier. Ces insectes sont en général relativement abondants et occupent la niche d'*Astylus atromaculatus* dans les Makhathini Flats. Nos résultats montrent aussi que dans certains cas et souvent sur les plantes sauvages, les Formicidae se font remarquer par leur grand nombre. Certaines fourmis sont en effet connues pour être attirées par le sucre des nectaires floraux et extra floraux de diverses plantes (Keeler 1981). Enfin, nous avons constaté la présence de Diptères tout particulièrement des Drosophilidae chez le cotonnier cultivé. Ceux-ci peuvent s'observer en grand nombre dans la même fleur. Cependant leur densité dans les fleurs de cotonnier reste nettement inférieure à celle des Hyménoptères.

Dresser un inventaire des insectes présents sur les fleurs est une étape indispensable mais insuffisante pour apprécier le rôle pollinisateur des divers insectes. Pour comprendre la problématique posée il nous semble indispensable de rappeler quelles sont les étapes à

franchir pour qu'une pollinisation entomophile s'accomplisse. En premier lieu il faut garder en mémoire que le transfert de pollen se fait via l'individu. Les étapes sont les suivantes :

L'individu insecte doit être attiré par la fleur donneuse de pollen au moment où celle-ci émet du pollen viable. Dans de bonnes conditions environnementales, cette longévité pourrait permettre à certains insectes de transporter des grains de pollen viables sur des distances assez longues (voir chapitre I). Sa visite à cette fleur doit s'accompagner d'une charge en pollen sur le corps. Ensuite, dans un délai relativement bref (pour que le pollen reste viable), l'insecte doit être attiré par la fleur receveuse au moment où le stigmate de celle-ci est réceptif. La visite à la fleur receveuse doit s'accompagner d'une décharge de pollen suffisante sur le stigmate. La réussite de la fécondation et de la production finale dépendra ensuite de la plante et des conditions dans lesquelles elle vit. Il apparaît donc clairement qu'il est primordial de connaître le comportement de l'insecte vis-à-vis de la fleur ainsi que ses capacités à se charger et se décharger en pollen de fleur en fleur et à se déplacer.

C'est l'abeille *Apis mellifera* qui, en raison de son importance comme pollinisateur et en tant qu'insecte domestiqué, est la plus étudiée de ce point de vue. Les abeilles sont connues pour la rapidité et l'efficacité de leur butinage de fleur en fleur. Nous avons montré par exemple que le nombre de fleurs qu'elles visitaient à la minute était 40 fois supérieur à celui des *Astylus*. Leur motivation est de constituer des stocks importants de pollen et de nectar (miel) pour nourrir la colonie qui comprend jusqu'à 50 000 individus. Leur comportement vis-à-vis du coton a été abondamment étudié et tout particulièrement dans le cas de la production de semences hybrides où le transfert de pollen entre parent mâle et parent femelle est nécessaire. De ces nombreux travaux, il ressort que l'abeille peut être un bon pollinisateur du coton classique car elle augmente les rendements (MacGregor et al 1955 ; MacGregor et Todd 1956) en déposant des grains de pollen de fleur en fleur (MacGregor, 1959). Son utilité a été aussi maintes fois démontrée par Moffet et al. (1977, 1980), Waller et al. 1985, dans la production de coton hybride. Elle visite la fleur surtout pour le nectar car elle rechigne à collecter le pollen car il est difficile à agglomérer en pelotes en raison des épines qu'il présente à sa surface (Vaissière et Vinson, 1994). L'abondance des abeilles peut être différente selon le génotype du cotonnier étudié. Certains cultivars ou espèces seraient plus attractives que d'autres (Moffett et al. 1975). Le rôle des nectaires dans l'attraction ne fait pas l'unanimité : Afzal et Khan 1950 soulignent bien qu'elles sont « la réelle source d'attraction » alors que plus tard, Moffett et al. (1975) constatent que « la présence de glandes et la localisation des nectaires n'a pas fortement changé le taux de visite chez l'abeille ». En fait, non seulement l'accessibilité au nectar autrement dit la localisation des nectaires est un facteur d'attractivité mais la quantité et la qualité (concentration) du nectar produit est également un facteur attractif essentiel. Ainsi, Vansell (1944) puis plus tard Loper et Davis (1985) ont mis en évidence l'étroite corrélation entre la sécrétion de nectar et la fréquence des insectes dans les fleurs. De plus, cette collecte de nectar peut selon la morphologie florale du génotype entraîner une spécialisation de l'individu abeille sur un morphotype : chaque abeille préfère rester sur un type floral et l'on a deux populations séparées de butineuses. Ce comportement décrit chez le colza (Pierre et al. 1996) semble avoir été signalé sur coton (Jaycox et Carter cités par Loper et Davies, 1985), Ceci peut constituer un frein à l'intercroisement intraspécifique lorsque les fleurs des deux lignées parentales sont morphologiquement différentes. Un autre problème concernant la structure de la fleur peut empêcher la pollinisation. Parfois les abeilles collectent le nectar sans avoir à entrer en contact avec les organes reproducteurs dans ce cas charge et décharge sont quasi nuls. L'observation de la forme de la fleur et de la posture de l'insecte permet de comprendre certains déficits de pollinisation. Dans nos conditions expérimentales, la forme des fleurs permettait sans doute des contacts avec les étamines puisque nous avons montré que la charge avait bien lieu sur les cultivars observés puisqu'elle atteignait environ 500 grains de pollen.

Le comportement des *Astylus* par contre est très mal connu. C'est une originalité de ce travail que d'en avoir étudié certains aspects. Müller (1883) a décrit leur comportement anthophile et Human et Nicolson (2003) ont démontré que cet insecte est un grand consommateur de pollen. Un auteur sud-africain, du Toit (1990), a souligné aussi le rôle de cette espèce dans la pollinisation du tournesol (*Helianthus annuus* L.). Il apparaît donc que l'*Astylus* consomme le pollen dans la plante mais ne montre pas de comportement de stockage comme les Apidés. Nos observations sur le taux de visite montre que seulement 0.21 fleurs sont visitées par minute. Ceci atteste que les *Astylus* restent dans la fleur pour y avoir d'autres activités que le nourrissage (repos, accouplement). Ceci est confirmé par nos résultats concernant leurs déplacements. Si l'on prend les cas extrêmes, un individu peut être retrouvé à une distance de 1 m au bout de 5 minutes (soit un déplacement de 12m/h) alors qu'un autre peut être retrouvé à 150 m au bout de 2h (soit un déplacement de 75m/h). Il ne peut s'agir de vitesse de vol direct et ces valeurs très faibles confirment bien que les *Astylus* passent de fleur en fleur en y effectuant des arrêts prolongés. Pour cette raison, leur capacité de dispersion reste faible et nos données ont montré que la plupart restent cantonnés dans un rayon de 25m à partir de la zone du lâcher. Même en supposant que la technique de coloration des individus ait ralenti leurs déplacements, nous avons constaté le maintien des *Astylus* sur les fleurs. Ce séjour prolongé sur les fleurs entraîne une charge pollinique de leur corps qui n'est pas négligeable puisqu'elle est du même ordre que celle évaluée sur les abeilles domestiques. Nous avons également vu que les *Astylus* étaient capable de franchir des zones de friches. Compte tenu de ce comportement et de leur charge pollinique ils pourraient être des contaminateurs potentiels entre parcelles mais ceci à un taux de risque qui resterait faible.

En ce qui concerne les Diptères, eux aussi ont l'habitude d'utiliser les fleurs comme lieu de nourrissage et d'accouplement (Hunter, 1979) mais les Drosophilidae qui peuvent être très nombreux (c'est le cas à Makhathini) ont une charge pollinique très faible. Il est intéressant de noter que les Bombyliidae n'ont jamais été recensés sur le cotonnier cultivé durant les deux campagnes agricoles alors qu'ils semblent relativement fréquents sur le cotonnier sauvage. Enfin, les thrips dont la charge pollinique est quasi nulle peuvent se rencontrer en nombre important dans les fleurs de cotonnier et se nourrir de grains de pollen (Grinfeld 1959, Kirk 1984, 1987). Le rôle des thrips dans la pollinisation a été démontré dans de nombreuses publications spécialement chez les Ericacea et les Dipterocarpaceae (Appanah et Chan 1981, Hagerup et Hagerup 1953) mais il est difficile compte tenu de leur charge d'imaginer qu'ils puissent avoir un rôle important dans la pollinisation du cotonnier.

L'effet du transgène Bt sur les populations d'insectes

En ce qui concerne l'effet du transgène Bt sur les population d'insecte, nos résultats ne mettent pas en évidence un effet direct de celui-ci. Le plus souvent le nombre d'insectes/100 fleurs épanouies est identique sur cotonnier qu'il soit transgénique ou non. Seules des différences significatives apparaissent pour les *Astylus* à Marble Hall où ils sont plus fréquents sur le coton Bt. Des différences sont notées également pour *Apis mellifera* sur un seul site (Makhathini) et dans ce cas elles sont moins nombreuses sur le cotonnier Bt. A Rustenburg on n'observe aucune différence pour les *Astylus* et les abeilles. Par contre des différences sont notées pour les Scoliidæ, les Nitulidæ moins nombreux sur le cotonnier transgénique alors que les Jassidæ sont plus nombreux. En résumé lorsque des différences existent, elles sont aussi bien dans un sens que dans l'autre. Les conditions environnementales

et les pratiques culturales des divers sites, la distance entre parcelles Bt et non Bt, les densités et décalages de floraison sont autant de facteurs explicatifs possibles de ces différences.

Bien que la question se pose peu en Afrique du Sud où le coton Bt est très majoritairement cultivé, les risques de croisements entre coton Bt et non Bt via les insectes sont théoriquement possibles puisque les insectes ne semblent pas être affectés par la présence du transgène du moins lorsqu'il s'agit de comparer des lignées ayant le même fonds génétique. La mise en place de distance d'isolement de plus de 1,5 km avec barrière végétale est une solution préventive qui a déjà été étudiée de longue date dès les années 1930 dans le cadre de l'obtention de variétés pures (Pope et al., 1944).

Dans de nombreux cas, le cotonnier Bt est plus floribond que la lignée (isogénique) non Bt. L'origine de cette différence de densité florale entre le cultivar Bt et les autres de même fonds génétique pourrait résider non pas dans une différence (génétique) de production florale mais dans la meilleure conservation des squares chez le cultivar Bt conférée par le gène Cry1Ac.

Les risques de croisements interspécifiques

Notre étude de l'entomofaune sur *G. herbaceum*, *Hibiscus trionum* et *H. canabinus* a montré que les Astylus et les abeilles domestique ne sont pas présents sur ces espèces. Par contre des Apoïdæ sauvages dont les Anthophoridae et les Megachilidae sont communs à *G. hirsutum* et *G. herbaceum* or parmi ceux-ci les anthophoridae ont une grande capacité à se charger en pollen. Ils pourraient constituer des vecteurs potentiels de pollen entre les deux espèces. Il pourrait en être de même pour les Meloidae (en particulier *Milabris oculata*) qui bien qu'ayant une charge pollinique plus faible sont parfois très nombreux et peuvent être très ubiquistes et mobiles. Cependant les risques sont sans doute limités car la faible fréquence de visites sur ces plantes nous a conduit à augmenter le temps d'observation des fleurs à 3 minutes pour collecter des données.

Que ce soit pour la pollinisation entomophile du cotonnier transgénique et non transgénique ou pour l'étude des risques de croisements interspécifiques via les insectes, de nombreuses études restent à mener. Elles sont particulièrement délicates à mettre en place car elles sont effectuées sur le terrain. Les connaissances principales à acquérir concernent la capacité de dispersion des insectes. Des études expérimentales en milieu plus confiné pourraient permettre de connaître l'intensité des dépôts polliniques effectués par principaux insectes candidats à la pollinisation. Enfin une étude du comportement de ceux-ci sur les différents types de fleurs concernées dans les croisements (étude des postures, choix ou préférence pour un type de fleur) devraient permettre de compléter nos connaissances pour mieux apprécier les risques de flux de gène intra et interspécifiques.

Références bibliographiques

- Afzal M. and Khan, H. 1950.** Natural crossing in cotton in western Punjab. *Agron. J.* 42, 14-19.; 89-93; 202-205; 236-238.
- Appanah S, Chan H.T. 1981.** Thrips: pollinators of some dipterocarps. *Malyas. For.* 44: 234-252.
- Delvare G., Aberlenc H-P. 1989.** Insectes d'Afrique et d'Amérique tropicale. Clés pour la reconnaissance des familles. CIRAD, laboratoire de faunistique-GERDAT. Montpellier, France. 302 p.
- Demol J. 1992.** Le cotonnier au Zaïre. Publication agricole 29, A.G.C.D.Bruxelles, Belgique. 247 p.
- Du Toit A.P. 1990.** The importance of certain insects as pollinators of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *S.Afr.J.Plant Soil*, 7 (3), 159 :162
- Free, J.B. 1993.** Insect Pollination of Crops (2nd ed.). Academic Press Limited, London. 684p.
- Grinfeld E.K. 1959.** Feeding of thrips on the pollen of flowers and the origin of asymmetry in their mouthparts. *Entomol. Rev.* 38:715-720.
- Hagerup E, Hagerup O. 1953.** Thrips pollination of *Erica tetralix*. *New Phytol.* 52:1-7.
- Human H., Nicolson S.W. 2003.** Digestion of maize and sunflower pollen by the spotted maize beetle *Astylus atromaculatus* (*Melyridae*): is there a role for osmotic shock? *Journal of Insect Physiology*
- Hunter A.S. 1979.** New anthophilic *Drosophila* of Columbia. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72: 372-383.
- Ish-Am, G, Eisikowitch, D 1998.** Mobility of honey bees (*Apidae, Apis mellifera* L.) during foraging in avocado orchards. *Apidologie* 29: 209-219.
- Johansson T.S.K. 1959.** Tracking Honey Bees in cotton fields with fluorescent pigments. *Journal of Econ. Ent.* 52(4): 572-577
- Keeler K.H. 1981.** Function of *Mentzelia nuda* (*Loasaceae*) post floral nectaries in seed defence. *Am.J. Bot.* 68: 295-299.
- Kevan P.G. 1983.** Flower colours through the insect eye: what they are and what they mean. In handbook of experimental pollination. Ed. C.E. Jones, J Little. New York: Von Nostrand (à compléter).

Kevan P.G., Baker H.G. 1983. Insects as flower visitors and pollinators. Annual review of Entomology. 28. Published by Annual Reviews Inc., Palo Alto, Ed. Mittler T.E., Radovsky F.J., Resh V.H. 407-453.

Kirk W.D.J 1984. Pollen-feeding in thrips (Insecta :Thysanoptera). J.Zool., Lond. 204: 107-117.

Kirk W.J.D. 1987. How much pollen can thrips destroy ? Eco. Entomol. 12: 31-40.

Loper G.M, Davis D.D. 1985. Disparity of cotton pollen dispersal by pollen bees visiting upland and Pima pollen parents. Crop Science 25: 585-589.

McGregor, S.E., Rhyne, C., Worley, S., and Todd, F.E. 1955. The role of honey bees in cotton pollination. Agron. J.47, 23-25.

McGregor, S.E. and Todd, F.E. 1956. Honeybees and cotton production. Glean. Bee Cult. 84, 649-652, 701.

McGregor, S.E. 1959. Cotton-flower visitation and pollen distribution by honey bees. Science, N.Y. 129, 97-98.

Moffett J.O., Stith L.S., Burkhardt C.C., Shipman C.W. 1975. Influence of cotton genotypes on floral visits of honey bees. Crop Science 15: 782-784.

Moffett J.O., Stith L.S., Burkhardt C.C., Shipman C.W., 1976 a. Insect visitors to cotton flowers. Arizona Academy of Science. 11 : 47-48

Moffett J.O., Stith L.S., Burkhardt C.C., Shipman C.W., 1976 b. Nectar secretion in cotton flowers and its relation to floral visits of honey bees . American bee journal 116 : 32, 34, 36.

Moffett J.O., Stith L.S., Shipman C.W, 1977. Producing hybrid cotton seed on the High Plains of Texas. Proc.1977 Beltwide Cotton Research Conferences.

Moffett J.O., Stith L.S., Shipman C.W, 1979. Honey bees and the production of Hybrid seed cotton. American Bee Journal 119 : 492-493, 542.

Moffett J.O., Cobb H.B., Rummel D.R., 1980. Bees of potential value as pollinators in the production of hybrid cottonseed in the High Plains of Texas. Proc. 1980 Beltwide Cotton Research Conferences.

Munro J.M. 1987. Cotton. Longman Scientific & Technical, N.Y. 436 p.

Nicolson S.W. 1994. Pollen feeding in the eucalypt nectar fly, *Drosophila flavohirta*. Physiological Entomology 19: 58-60.

Picker M., Griffiths C., Weaving A. 2003. Field guide to insects of South Africa. .Struik, Cape Town, S.A. 441 p.

Pierre J., Renard M., 1999. Does short distance isolation reduce pollen dispersal by honey bees? . Proc. Xth International Rapeseed congress , 26-29 September 199, Canberra, Australia (CD Rom, 5p).

PIERRE J., PIERRE J.S., MARILLEAU R., PHAM-DELEGUE M.H., TANGUY X., RENARD B., 1996. Influence of the apetalous character in rape (*Brassica napus*) on the foraging behaviour of honeybees (*Apis mellifera*). *Plant Breeding*, 115, 484-487.

Loper G.M., Davis D.D., 1985. Disparity of pollen cotton pollen disposal by honey bees visiting Upland and Pima pollen parents. *Crop Science* 25 : 585-589.

Pope O.A., Simpson D.M., Duncan E.N., 1944. Effect of corn barrier on natural crossing in cotton. *Journal of Agricultural Research* 68 : 347

Riley J.R., Greggers U., Smith A.D., Stach S., Reynolds D.R., Stollhoff N., Brandt R., Schaupp F., Menzel R. 2003. The automatic pilot of honeybees. *The Royal Society*. 03PB0367-1 :3.

Scholtz C.H., Holm E.1996. Insects of Southern Africa.University of Pretoria. South Africa. 502 p.

Sidhu A.S., Singh S., 1961. Studies on agents of cross pollination in Cotton. *Indian cotton growing review*, 15: 341-353.

Stephens S.G, Finkner M.D. 1953. Natural crossing in cotton. *Econ.Bot.*7:257-269.

Vaissière B.E., Moffett J.O., Loper G.M. 1984. Honey bees as pollinators for hybrid cotton seed production on the Texas high plains. *Agronomy Journal* 76. 1005-1010.

Vaissière B.E., Vinson B., 1994. Pollen morphology and its effect on pollen collection by honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), with special reference to upland cotton, *Gossypium hirsutum* (Malvacea). *Grana* 33: 128-138.

Vansell G.H. 1944. Cotton nectar in relation to bee activity and honey production. *Journal of Economic Entomology* 37 (4): 528-530.

Waller G.D., Moffett J.O., Loper, G.M., Martin J.H.1985. An evaluation of honey bee foraging activity and pollination efficacy for male-sterile cotton. *Crop Sci.* 25(2), 211-214.

CHAPITRE III

Estimation de la dispersion du pollen dans des populations de cotonniers

J-L Hofs^a, A.-M. Chèvre^b, J. Pierre^b, B. Hau^a, D. Marais^c

a : Cirad-Ca, UPR Systèmes Cotonniers, Montpellier, France.

b : Inra, Centre de Rennes, France.

c : Université de Pretoria, Dept. of Plant Production and Soil Science, Afrique du Sud.

Etude bibliographique

La dispersion du pollen chez le cotonnier en conditions naturelles est très variable.

La présence d'insectes influence fortement les taux d'hybridations (intercroisements) (Elfawal et al. 1976 ; Moresco et al. 1999) et fluctue en fonction du lieu et du temps (Moffett et al. 1975, 1976). De nombreuses études basées sur l'observation au champ rapportent des taux d'hybridation inférieurs ou égal à 10% (Meredith & Bridge 1973 ; Gridley 1974 ; Theron & Van Staden 1975 ; Elfawal et al. 1976 ; Umbeck et al. 1991 ; Llewellyn & Fitt 1996). Des pourcentages plus élevés atteignant 25% ont été mentionnées mais sont moins fréquents (Smith 1976 ; Moresco et al. 1999). Certains auteurs (Richmond 1951 ; Oosterhuis & Jernstedt 1999) ont rapporté des fréquences atteignant 80%.

Chez les cotonniers diploïdes, la dispersion naturelle du pollen n'a pas été aussi profondément investiguée que chez les espèces tetraploïdes cultivées. Aucune donnée d'intérêt n'a pu être rassemblée sur *G. herbaceum*. Cependant une espèce proche de *G. herbaceum* a été étudiée : *G. arboreum* (var *neglectum*, forma *bengalensis* Hutchinson and Ghose) dont le cultivar indien (39-Mollisoni) a été utilisé par Afzal et Khan (1950) dans des essais de dispersion. Dans ces essais, les taux d'allogamie ne sont pas différents de ceux observés chez *G. hirsutum* (2% environ à 1 m de distance).

En Australie, Brown et al. (1994) indiquent que les taux d'allogamie chez *G. australe* et *G. sturtianum* sont faibles sans pour autant indiquer des distances de dispersion précises.

De nombreux auteurs (Thomson 1966 ; Mungomery & Glassop 1969 ; Galal et al. 1972 ; Theron & Van Staden 1975 ; Elfawal et al. 1976 ; Chauhan et al. 1983 ; Umbeck et al. 1991 ; Llewellyn & Fitt 1996) s'accordent à dire que les intercroisements sont localisés près de la source de pollen et décroissent significativement avec la distance.

Ces résultats proviennent de populations homogènes de cotonniers, c'est-à-dire de champ sans discontinuité de végétation. Dans le cas de parcelles séparées par un terrain nu les taux d'hybridations sont relativement plus élevés pour une distance donnée par rapport à la source (Green & Jones 1953 ; Galal et al. 1972).

Le tableau 3-1 présente une sélection non exhaustive des fréquences de croisements naturels chez le cotonnier upland en fonction de distances très variées.

Tableau 3-1 : fréquences de croisements naturels selon la distance de la source chez *G.hirsutum*

Distances à la source (m)			1	5	10	15	25	30	100	150
Auteur	année	Lieu	Pourcentages de croisements naturels							
Stephens		Texas	100	57	-	-	-	-	-	-
Simpson	1954	Tenn.	27.2		4.5	2.5	2.6	-	-	-
Afzal	1947	Inde	1.78	0.19	0.085	0.0135	0.0188	0.0808	0	0
Llewellyn	1996	Austral	0.15	0.08	-	0.03	-	-	-	-
Xanthopoulos	2000	Grèce	3.85	-	0.31	-	-	-	-	-
Brown (1)	1918	Miss	5.6	<1	0	0	0	0	0	0
(2)	1919		14.8	3.2	1.9	0.6	-	-	0.06	-
Pope et al.	1944	Ten	-	-	-	-	-	-	-	0.9

Etudes de terrain

Les études relatives à la modélisation de la dispersion du pollen dans des peuplements de cotonniers sont regroupées dans l'action 5 du projet « flux de gènes ». Durant cette campagne 2004-2005 trois essais ont été mis en place dans des stations de recherche sous la supervision d'agronomes de l'ARC :

- 1) essai de dispersion dans une population homogène de cotonniers à Rustenburg.
- 2) essai de dispersion dans une population homogène de cotonniers à Makhathini.
- 3) essai de dispersion entre parcelles (population discontinue) de cotonniers à Rustenburg.

L'essai de dispersion dans une population homogène de cotonniers à Rustenburg a été reconduit sur la parcelle utilisée l'année précédente et dont les cotonniers avaient été recépés après récolte. Les plantes ont repoussé et ont donné une densité de population suffisamment satisfaisante que pour réutiliser le matériel végétal en deuxième année (moyennant une modification de la taille des capteurs de pollen).

Les résultats observés à Rustenburg en 2003-2004 avançaient l'hypothèse du rôle de *Astylus atromaculatus* dans la pollinisation croisée et la discontinuité de fréquences qui pourraient en être la cause. Entendu que l'objectif de l'étude dépasse l'approche descriptive pour tendre vers une approche plus prévisionniste, il était nécessaire de vérifier la possibilité de transposer le résultat de Rustenburg dans un autre environnement où le coléoptère serait absent. Par conséquent, l'essai de dispersion dans une population homogène de cotonniers a été implanté à la station de recherche agronomique de Makhathini selon un protocole similaire à celui de Rustenburg en 2003-2004 (seule la superficie du champ récepteur a été modifiée).

Enfin, pour répondre aux questions concernant la dispersion du pollen dans le cas de parcelles discontinues, un essai a été établi prenant en compte une séparation de sol nu et une parcelle de tournesols.

L'ensemble des récoltes a été traité à la station ARC de Rustenburg. Le semis des graines viables des capteurs récoltés en juin 2005 dans les 3 essais a eu lieu le 17/10/2005. Les comptages ont été effectués durant les mois de novembre et décembre.

Présentation des résultats

Les résultats sont présentés sous deux angles à la fois différents et complémentaires. Dans un premier temps et à la suite de la présentation du protocole de chaque essai, nous reprendrons l'approche « ponctuelle » de dispersion des fréquences présentée dans le rapport de la campagne antérieure et qui aborde les résultats en fonction de la position des fréquences d'hybridation dans le champ. En fin de chapitre (page 83) nous présenterons une approche plus globale de la dispersion en tenant compte des fréquences moyennes d'hybridation en fonction de l'éloignement de la source de pollen.

1 Essai de dispersion dans une population homogène de cotonniers à Rustenburg

Protocole expérimental

Au centre d'une parcelle de cotonnier (Nu Opal) de 1 hectare, a été semé une micro parcelle de 10m*10m d'une variété de cotonnier (DPL 5690RR) possédant un gène marqueur (Round Up Ready). La parcelle centrale est appelée émettrice [PE] ou encore source, son enceinte est appelée parcelle réceptrice [PR]. Après une campagne d'essai en 2004, les cotonniers ont été coupés à 10 cm du collet, en intercampagne. Les premières repousses sont apparues mi-septembre 2004. Le recépage des plants (appelé ratooning) a l'avantage d'obtenir une floraison plus précoce. La densité de population avoisinait 30.000 plants/ ha, soit une occupation plus relâchée du terrain qu'en 2004.

Observations réalisées en cours de campagne :

Observation des pollinisateurs (rapportée dans la partie 2).

Indication des vents dominants.

Enregistrement des conditions climatiques (nombre de jours de pluie pendant la floraison, quantité en mm).

Description des capteurs :

Compte tenu de la faible densité de population dans le champ, la taille, la structure et le nombre des capteurs ont été modifiés par rapport à l'année précédente : le capteur était constitué de toute plante contenue dans un périmètre de 2 x 3 m à la position indiquée.

Comme sur une mappemonde, nous avons défini l'emplacement d'un capteur par rapport à sa « longitude » et sa « latitude », exprimée en mètre ou degré par rapport au méridien 0 (matérialisée par la ligne centrale verticale du plan parcellaire) et l'équateur (matérialisé par la ligne horizontale centrale du plan parcellaire). Nous appellerons ce système de localisation « référentiel champ » [RC].

Tous les 10 mètres, selon une grille 10*10 à travers la PR, des « capteurs de pollen » ont été identifiés.

Conditions environnementales

Les côtés est et nord (en coordonnées géographiques [CG]) du champ étaient bordés par des cultures de tournesol. La parcelle de cotonnier la plus proche était située à 750 mètres de la bordure du champ expérimental. La zone résidentielle longeait le côté ouest du champ et au sud [CG], se trouvait une zone de taillis. L'utilisation de ruches additionnelles en bordure de champ n'a pas eu lieu cette année.

Le nombre de jours pluie n'a pas été trop élevé dans l'ensemble (Figure 3-2): c'est au mois de décembre 2004 que la pollinisation a été le plus perturbée (12 jours). A noter qu'un jour considéré comme pluvieux correspond à une précipitation supérieure à 1mm.

Les vents dominants soufflent dans la direction nord-est – sud ouest.

Figure 3-1 : Schéma de l'essai de dispersion dans un peuplement homogène (Rustenburg).

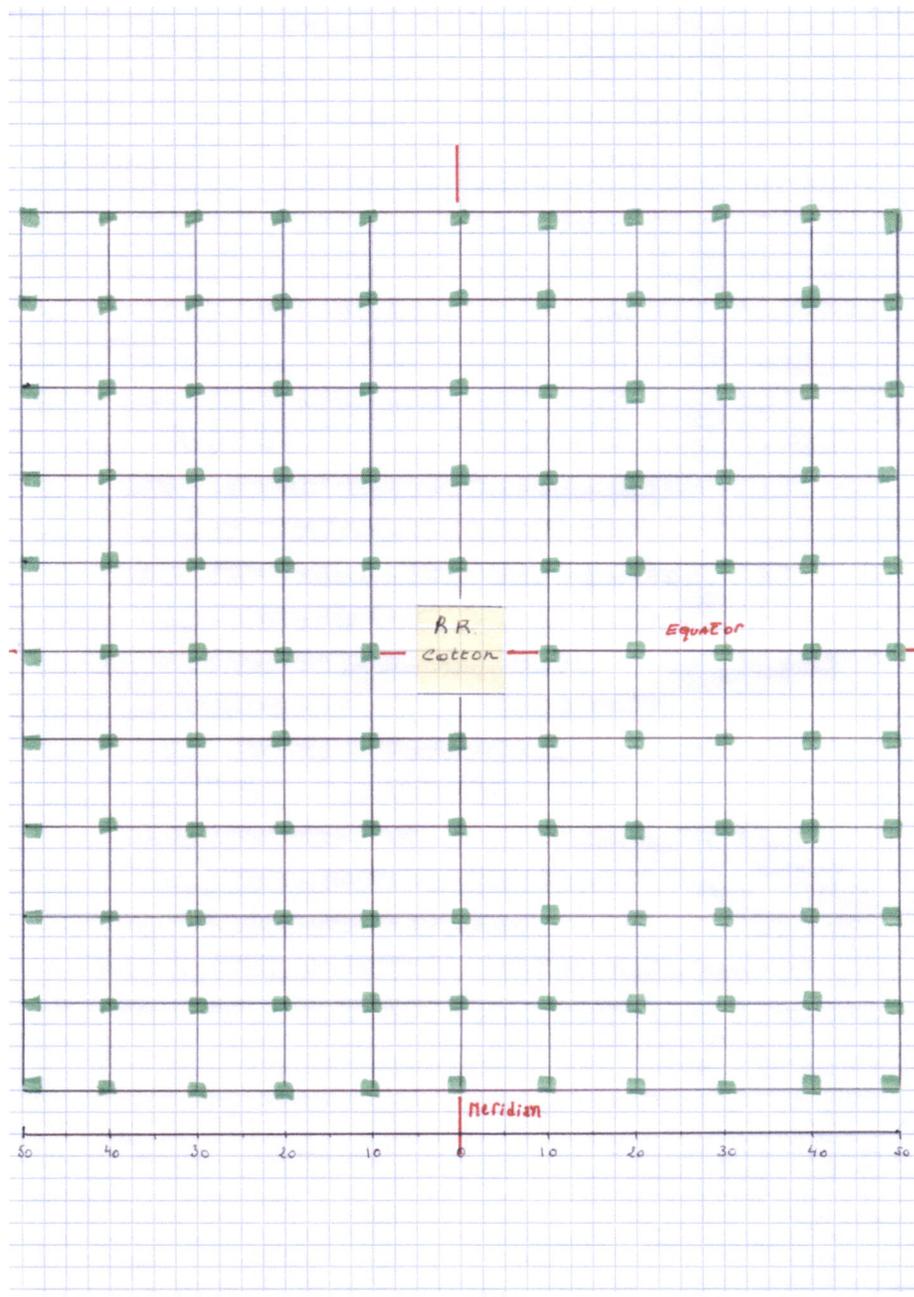
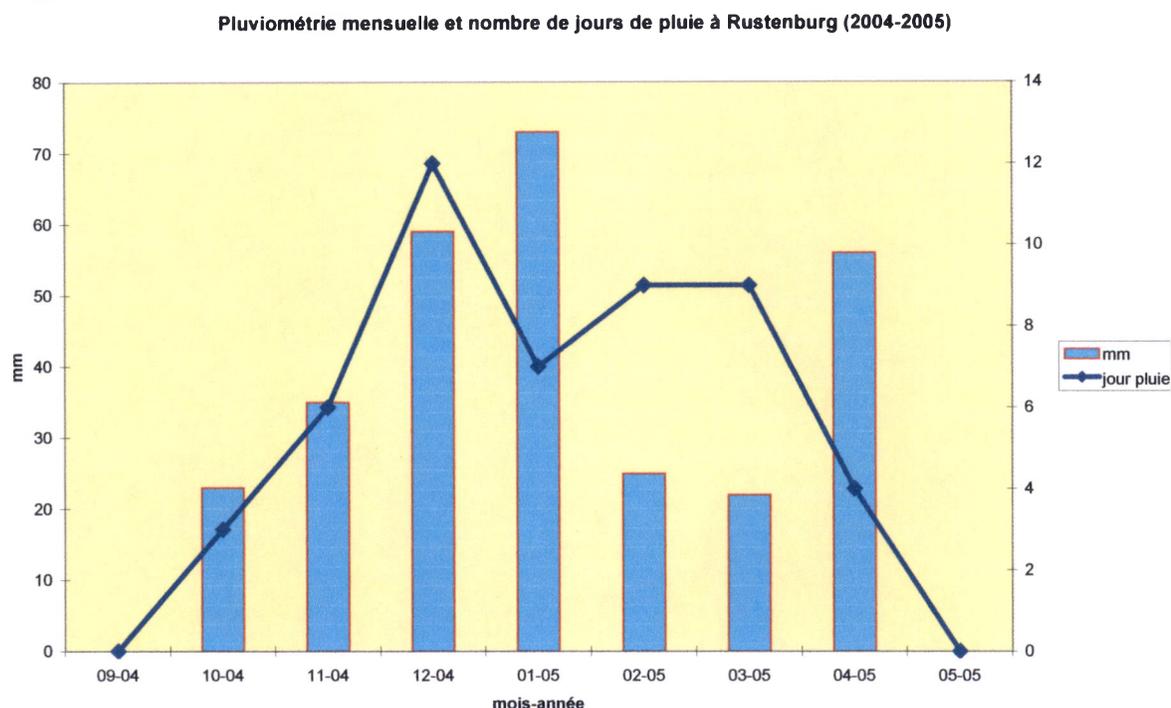


Figure 3-2 : Précipitations mensuelles à Rustenburg

Récolte et conditionnement des semences

Les capteurs composés d'un nombre variable de plants, ont été récoltés individuellement dans des sachets de papier. Le coton-graine a été égrené et les graines conservées dans leur sachet individuel. Elles ont été ensuite délintées à l'acide et triées, puis les graines saines ont été séchées au soleil sur des cadres de treillis. Une fois sèches, les semences ont été comptées, pesées et placées dans sachets numérotés conformément à la grille de récolte du champ d'essai.

Semis de la descendance pour test d'hybridation et sélection

En octobre 2005 un terrain a été préparé pour le test de résistance au Glyphosate (RoundUp™). Les graines ont été semées à la main. Dans notre plan expérimental, un capteur correspondait à une ligne de semis dont la longueur était variable mais n'excédait pas 50 m. et dépendait de la quantité de semences disponibles. L'entièreté des graines a été semée en adaptant la densité de semis dans la ligne.

Les descendances des capteurs étaient regroupées en blocs correspondant aux lignes du champ de dispersion (désignées par une lettre -A,C ,E...). Ces blocs étaient encadrés de deux lignes de témoins : un témoin de la même nature que le récepteur (NuOpal) et un autre, Round Up Ready comme la PE. Ces témoins ont permis d'évaluer l'efficacité de l'application d'herbicide et la comparaison des symptômes.

Trois semaines après le semis, les plantules émergées ont été comptées sur l'entièreté de la ligne. Elles ont ensuite reçu deux applications de Glyphosate à une concentration de 2 l/ha dans un intervalle de 15 jours. La lecture des symptômes consistant à compter le nombre de

plants sains (ne présentant pas de signes de dessèchement ou brûlures) a été réalisée 10 jours après chaque pulvérisation.

Une seconde pulvérisation d'herbicide après la (première) lecture se justifie par la volonté de réduire le risque de compter des plantules n'ayant pas incorporé le gène et ayant esquivé le traitement comme résistante. Généralement l'absence de symptômes provient d'un mauvais réglage des buses de l'aspersion ou d'un recouvrement d'une plantule par un plant de plus grande taille. Cette seconde cause est contrôlée et remédiée si besoin lors de la première lecture. Cette méthode évite l'utilisation coûteuse (et peu disponible dans un pays en développement) d'un test de confirmation PCR au laboratoire à partir des plantules « résistantes » récoltées individuellement.

Résultats

Rappel des résultats de 2003-2004

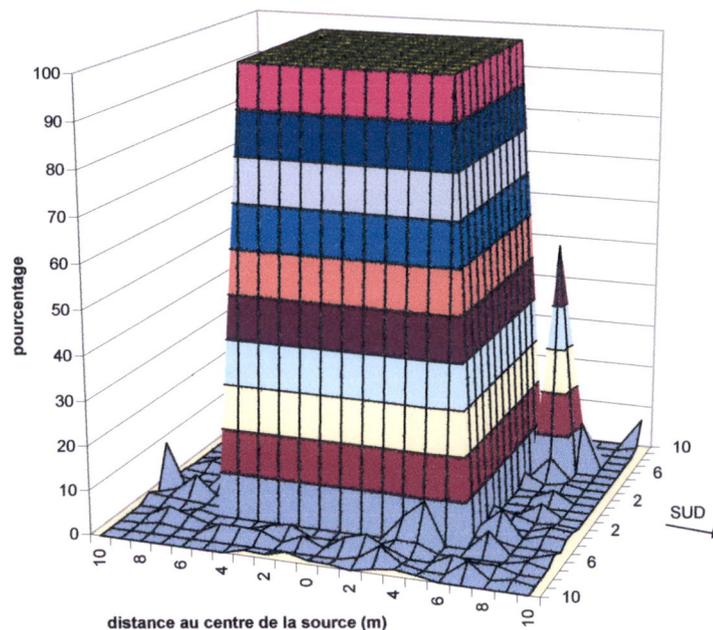
Nous présentons les résultats de la campagne précédente sous une forme graphique plus aisée à interpréter que le patchwork édité dans le rapport d'activités 2003-04.

La PE RR est représentée par le bloc de niveau 100% de fréquence. Les résultats sont présentés sous deux angles par rapport à l'orientation géographique du champ (face est et ouest) pour permettre la visualisation de l'entièreté des fréquences de croisement.

La distribution de fréquences observée dans nos essais en 2003-04 est relativement différente de celles publiées jusqu'alors. Les ordres de grandeur des fréquences sont nettement plus importants à Rustenburg. Dans le périmètre central correspondant à une bande de 5 mètres de large entourant la PE, les fréquences de croisement ont atteint, en un point, 54% à 2 mètres de la source (Figures 3-3 et 3-4). La moyenne du périmètre central (2.26%) est plus conforme aux observations antérieures mais reste quand même élevée. Les fréquences ne sont pas uniformément décroissantes et ne semblent pas répondre à une loi particulière. Dans le périmètre extérieur de 5 à 50 mètres de la source (Figures 3-5 et 3-6), les fréquences sont généralement inférieures à 1%. Cependant on observe à des distances variables des pics avoisinant 16% à 15-20 mètres de la source, 5% à 25 mètres et 11% à 35 mètres. La localisation de ces pics fait apparaître une distribution de fréquence encore plus inconstante que dans le petit périmètre.

**Figure 3-3 : Face ouest du champ expérimental, Rustenburg 2003-04, zone centrale (10 m).
Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur position dans le champ.**

Figure: pourcentages d'hybridation par rapport à une parcelle source dans un peuplement homogène de cotonniers dans la région de Rustenburg (RSA)



**Figure 3-4 : Face est du champ expérimental, Rustenburg 2003-04, zone centrale (10 m).
Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur position dans le champ.**

Figure: pourcentages d'hybridation par rapport à une parcelle source dans un peuplement homogène de cotonniers dans la région de Rustenburg (RSA)

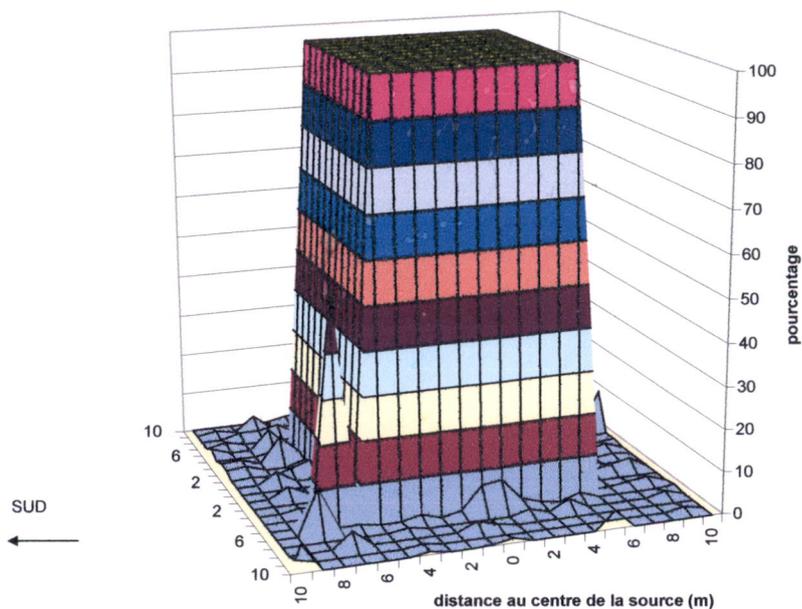


Figure 3-5 : Face ouest du champ expérimental, Rustenburg 2003-04, périmètre extérieur
 Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur position dans le champ.

Figure: pourcentages d'hybridation par rapport à une parcelle source dans un peuplement homogène de cotonniers dans la région de Rustenburg (RSA)

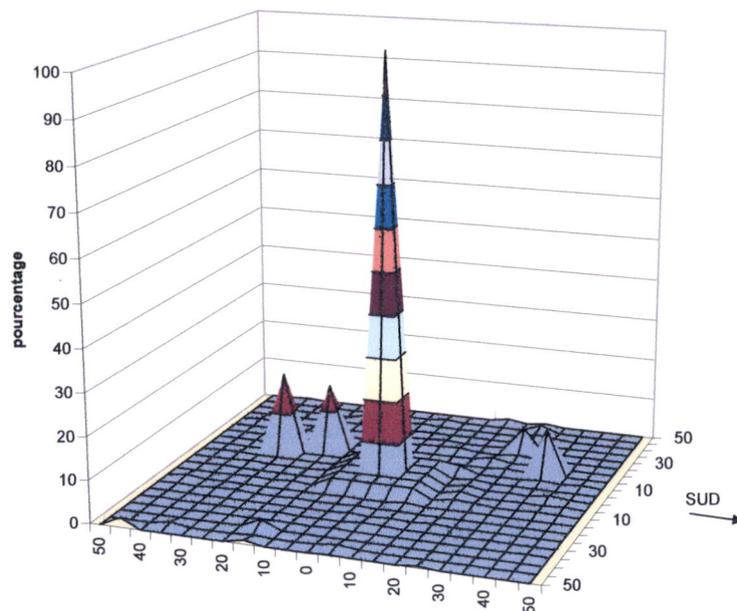
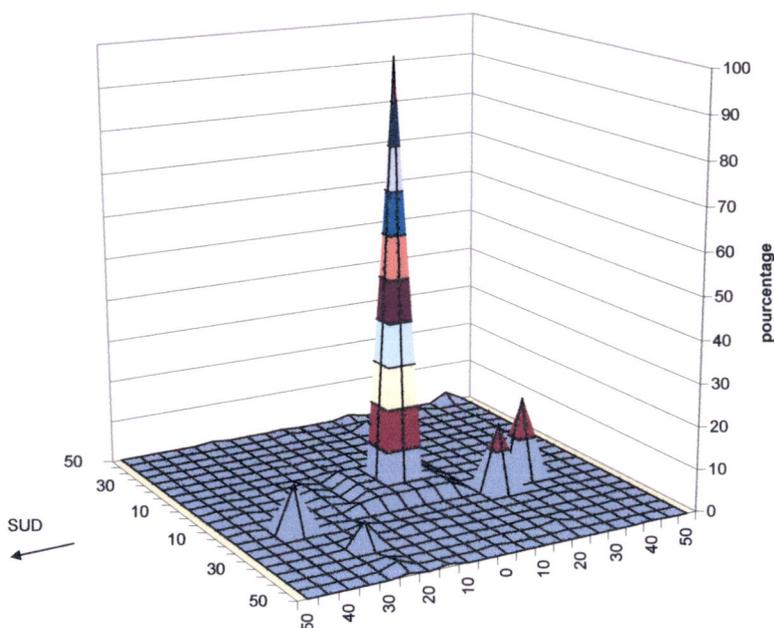


Figure 3-6 : Face est du champ expérimental, Rustenburg 2003-04, périmètre extérieur (50 m)
 Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur position dans le champ.

Figure: pourcentages d'hybridation par rapport à une parcelle source dans un peuplement homogène de cotonniers dans la région de Rustenburg (RSA)



Les résultats de 2004-2005

Le traitement au Glyphosate des lignes témoin a confirmé, comme la saison passée, le caractère résistant des semences issues du lot utilisé dans le semis de la PE et a attesté de la grande sensibilité de la variété NuOpal.

Le pouvoir germinatif des semences récoltées sur les capteurs est toujours faible (15-20%). La cause a pu être élucidée après discussion avec Antoon Cornelissen, Responsable de la division de sélection cotonnière à la Station ARC de Rustenburg selon lequel la mauvaise germination des graines provient des conditions climatiques (basses températures) relevées en fin d'été (février et mars). Pour peu que les semis soient tardifs, la qualité des semences s'en ressent et c'est la raison pour laquelle la région de Groblersdal (dans la province du Mpumalanga) est préférée à celle de Rustenburg pour la multiplication semencière commerciale.

Les graines sont de petite taille, de faible maturité et leur Seed Index (délimité) moyen est de 7.5 g.

Les fréquences (pourcentages) d'hybridation observées à l'issue de la saison 2004-2005 sont relativement moins importantes et d'amplitude moins élevée que la saison précédente. La figure 3-7 donne une image globale de la dispersion du pollen à partir de la parcelle centrale de RR matérialisée par le pic de 100%. Les fréquences d'hybridation estimées dans la partie réceptrice du champ sont toutes inférieures à 10% contrairement à ce qui avait été observé l'année précédente. Par contre le caractère discontinu et aléatoire de la dispersion est comparable aux résultats de 2003-2004. Le pic maximal d'hybridation (6.88%) est observé à 10 mètres à l'ouest de la PE.

Le format de la figure 3-7 ne permet pas de mettre ce pic de 6.88% d'hybride en évidence en raison de sa promiscuité avec la PE. Pour lever cette lacune, nous présentons une figure (Figure3-8) dans laquelle la PE artificiellement réduite à une fréquence égale à zéro. Cet artefact nous permet de mieux visualiser les pics de fréquences autour du centre du champ.

En 2004-05, l'intensité de la dispersion semble avoir été plus importante qu'en 2003-04. En 2003-04, les hybridations s'étaient produites principalement dans les zones géographiques sud-est et nord-est du champ avec un léger « spot » dans la partie nord-ouest. En 2004-05, la dispersion a été plus intense dans les zones (géographiques) sud-est et nord-est, qui n'en forment plus qu'une. Le flux a gagné la zone centrale et s'est accentué dans la partie nord-ouest.

Figure 3-7 : Essai de Rustenburg, 2005, population homogène, expression des fréquences sur une échelle de 100%.
Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur position dans le champ.

Pourcentage d'hybridation à partir d'une parcelle source centrale dans un peuplement homogène de cotonniers (Rustenburg 2005)

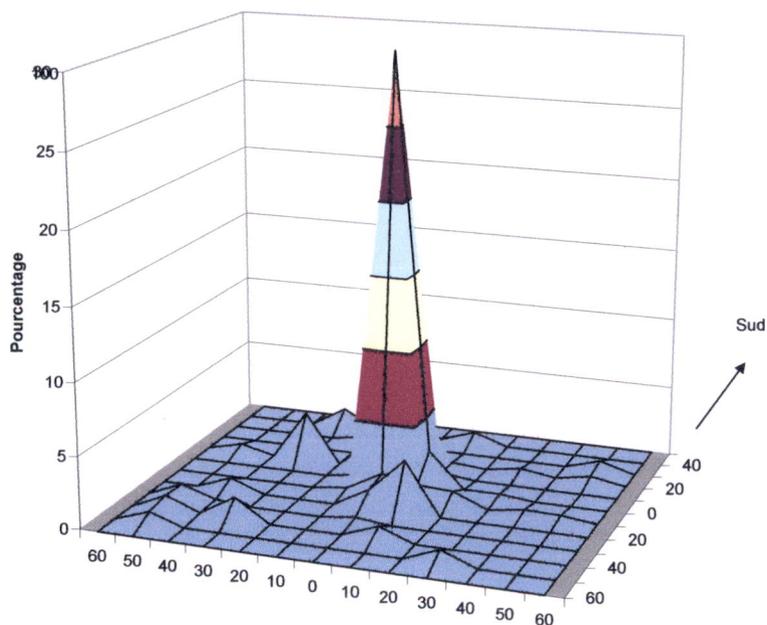
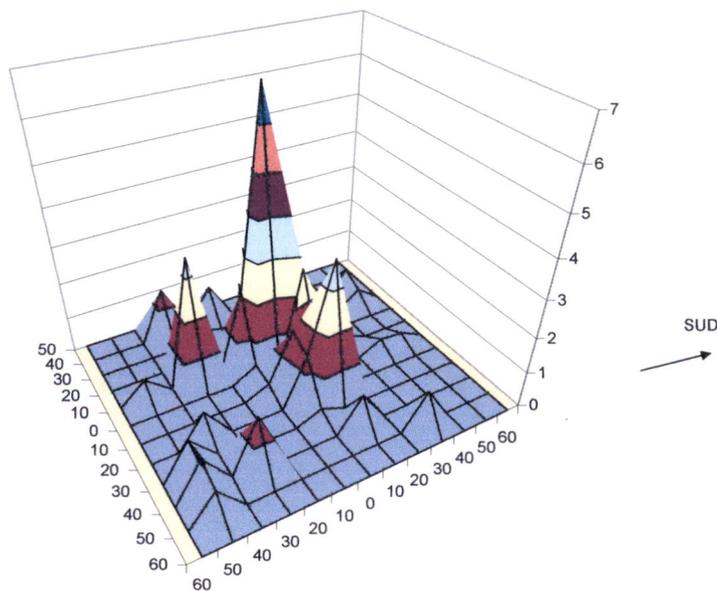


Figure 3-8 : Essai de Rustenburg, 2005, population homogène, expression des fréquences sur une échelle de 7% (parcelle émettrice effacée).
Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur position dans le champ.

Pourcentage d'hybridation à partir d'une parcelle source centrale dans un peuplement homogène de cotonniers (Rustenburg 2005)



Discussion

La direction des vents dominants ne semble pas influencer significativement le flux global de pollen dans le champ (sous-entendu qu'il pourrait conditionner le déplacement de certaines espèces telles que *Astylus atromaculatus*).

L'existence de pics de fréquence élevés provient généralement d'un capteur ayant produit un faible effectif de plantules F1 ($n < 50$). Bien que les pourcentages ne soient pas faux en soit, ils pourraient néanmoins être sous-estimés.

L'essai met en évidence des taux d'hybridation qui sont, en moyenne, de même ordre que ceux observés en 2004. Cependant les fréquences maximales observées en 2005 sont moins élevées que l'année précédente et cette différence pourrait être liée au changement de la taille des capteurs. En effet les capteurs choisis en première année d'essai étaient composés d'un nombre défini de plants (1, 3 et 9 selon leur positionnement par rapport à la PE) alors que l'année suivante, les capteurs étaient composés d'un nombre variable de plants pour peu que ceux-ci se situent dans un périmètre défini (2,5 m²). Une plus grande surface de captage a pu entraîner une dilution des fréquences « ponctuelles » qui se traduirait par un nivelage et par l'obtention de valeurs « moyennes ». L'absence des deux ruches d'appoint en 2004-05 ne peut pas être retenue puisque les abeilles domestiques ont été plus nombreuses durant cette dernière saison.

Les fréquences d'hybridation relativement élevées (supérieures à 1%) observées près des limites extérieures du champ suggère que malgré une tendance à la diminution en fonction de la distance, des pics de fréquence considérables peuvent encore apparaître au-delà des 50 mètres.

2 Essai de dispersion dans une population homogène de cotonniers à Makhathini (KwaZulu natal)

Protocole expérimental

Au centre d'une parcelle de cotonnier (Nu Opal) de 2500 m², est semé une micro parcelle de 10m*10m d'une variété de cotonniers possédant un gène marqueur (Round Up Ready). La parcelle centrale est appelée émettrice, son enceinte est appelée PR. Semis a été réalisé à une densité moyenne de 0.33*1m le 6 décembre 2004.

Observations réalisées en cours de campagne :

Observation des pollinisateurs (rapportée dans la partie 2).

Indication des vents dominants.

Enregistrement des conditions climatiques (nombre de jours de pluie pendant la floraison, quantité en mm).

Tous les 5 mètres, selon une grille 9*9 à travers la PR, des « capteurs de pollen » seront identifiés (très rapprochés, près du centre de la parcelle et plus distants vers le milieu).

Description des capteurs :

Comme sur une mappemonde, nous avons défini l'emplacement d'un capteur par rapport à sa « longitude » et sa « latitude », exprimée en mètre par rapport à la méridienne 0 (matérialisée par la ligne centrale verticale du plan parcellaire) et l'équateur (matérialisé par la ligne horizontale centrale du plan parcellaire).

(x) Sur Equateur et Méridien 0 (soit 4 directions cardinales) et latitude/longitude 6,11,15, 25 W, E, S, N, à 1, 5, 10, 20 m de la PE

Capteur : 3 plants mâle-stériles et 3 plants mâle-fertiles,

Soit à récolter 6 plants* 4 distances*4 points cardinaux= 96 plants (16 capteurs x)

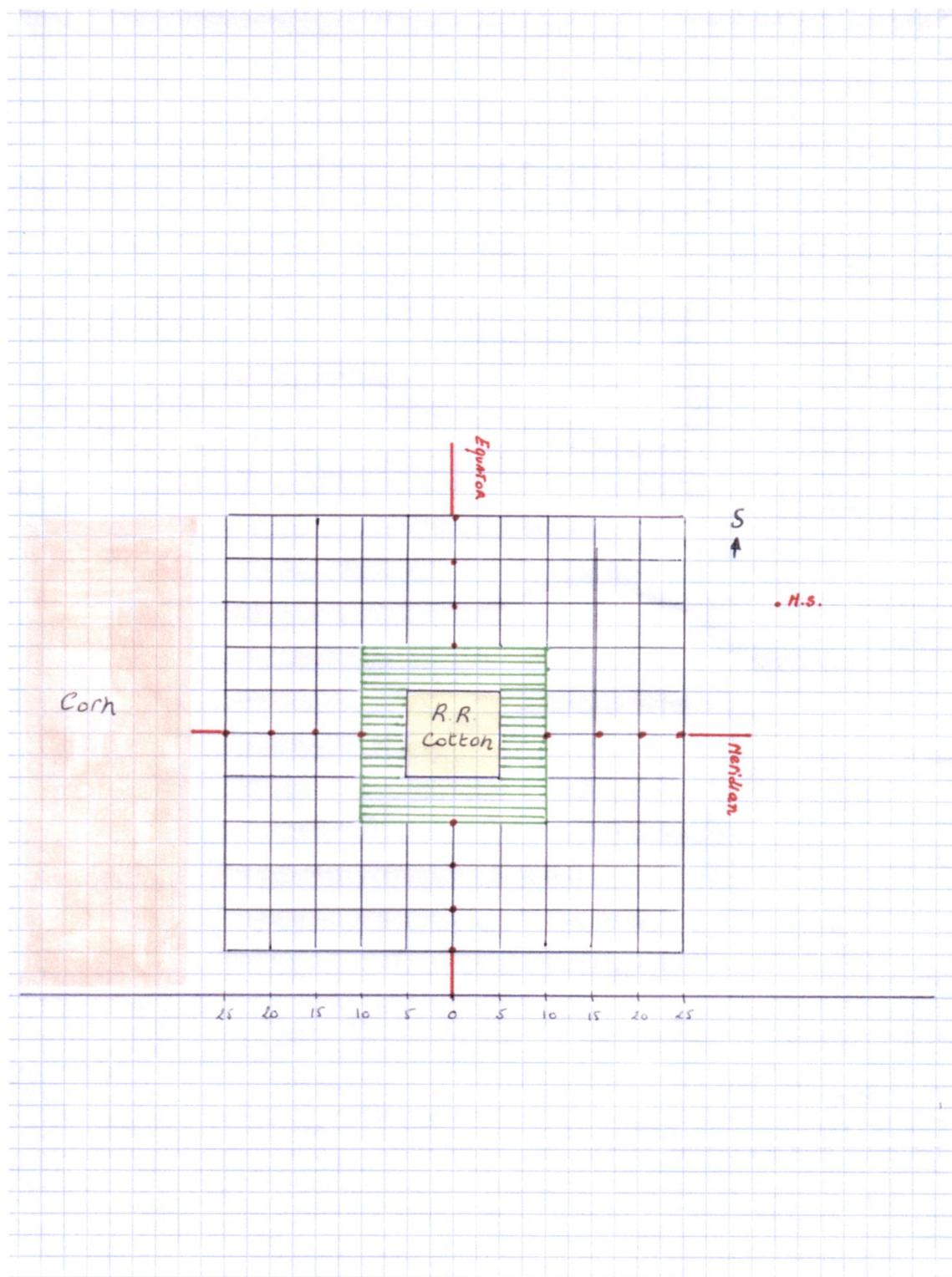
(°) Sur latitudes et longitudes 6, 7, 8, 9 et 10 (soit les 5 premières lignes (latitude) et les 5 premiers mètres (longitude) à partir de la parcelle centrale), à 1, 2, 3, 4 et 5m de la parcelle pollinisatrice, soit tous les mètres

Capteur : 1 plant mâle-fertile, soit à récolter 21*21 -11*11(carré central)= 320 plants (320 capteurs °)

(*) Sur latitude et longitude 15, 20, 25, à 10, 15, 20 m de la parcelle pollinisatrice,

Capteur : 3 plants mâles fertiles, soit à récolter 3plants *(6 lignes*11 sites+5lignes*6 sites) = 288 plants (96 capteurs *) – 8 capteurs(x) *3 plantes déjà récoltés sur Equateur et Méridien (capteurs x à 15 et 25 mètres)= 264 plants et 88 capteurs

Figure 3-9 : Schéma de l'essai de dispersion dans un peuplement homogène (Makhathini)

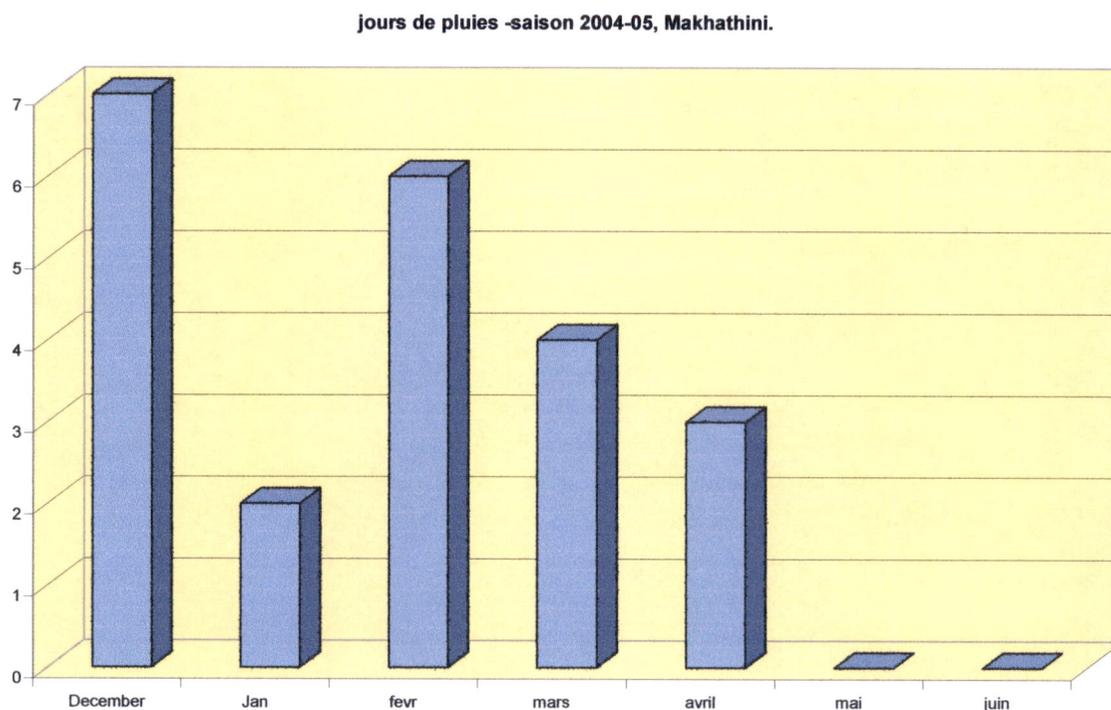


Conditions environnementales

Le champ d'essai a été implanté dans une partie (relativement) isolée de la station de recherche agronomique des Makhathini Flats. La plus proche bordure du champ était distante de 350 mètres d'un essai variétal de coton et à 400 m d'une ligne de variété transgénique RR. Pour limiter une éventuelle contamination par le pollen RR exogène, nous avons semé en bordure de l'essai une bande de 20 mètres de maïs.

La saison culturale a été relativement sèche et le nombre de jours de pluie n'a pas perturbé significativement l'activité des insectes.

Figure 3-10 : Fréquence mensuelle des pluies (jours/mois) à Makhathini, 2004-05



La direction des vents dominants est à prédominance sud-nord ou nord-sud.

Résultats

Dans le périmètre composé des capteurs à un plant (Figures 3-11 et 3-12), à proximité de la PE, on détecte des fréquences maximales supérieures à 20% (jusqu'à 40% pour deux pics). Leur répartition spatiale n'est pas homogène. Les fréquences plus faibles, inférieures à 10%, se retrouvent plus régulièrement réparties dans le périmètre.

Dans le périmètre extérieur (figure 3-13), composé des capteurs à trois plants, les fréquences maximales (2 pics de 7%) s'observent dans la zone nord (RG) du champ sous le vent dominant. Les autres fréquences (entre 0.1 et 2 %) s'observent dans la zone nord-nord-ouest (RG) du champ à des distances comprises entre 20 et 25 m de la source. Aucune fréquence n'a pu être détectée dans la zone sud est (RG).

Discussion

La structure de la dispersion du pollen à Makhathini n'est pas uniforme et présente des pics relativement élevés (30-40%) dans le voisinage de la PE (moins de 5m). En moyenne, la dispersion tend à se réduire avec la distance. Nous n'avons pas pu définir à ce point de l'analyse si cette relation suivait une fonction linéaire comme décrite dans Fryxell (1956).

Deux des trois fréquences maximales observées dans le périmètre des 5m sont situées du côté du rideau de maïs supposé protéger le champ du flux de pollen étranger. Compte tenu de la distance existant entre l'essai de dispersion et les parcelles d'essai variétaux, et la dispersion des lignées RR dans le dispositif expérimental, la probabilité d'une fécondation avec du pollen exogène peut être considérée comme faible.

La dispersion du pollen à moyenne distance (périmètre des 25 m) est relativement faible, à l'exception de deux pics inférieurs à 8%, et localisée. La présence de ces deux maxima ne peut être attribuée à *Astylus atromaculatus* puisque cette espèce n'a pas été recensée dans la région de Makhathini. Ici encore, ces valeurs élevées correspondent à des effectifs de plantules germées relativement bas ($n < 50$).

Figure 3-11 : Face est de l'essai de Makhathini, 2005, périmètre récepteur central (5 m).
 Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur position dans le champ.

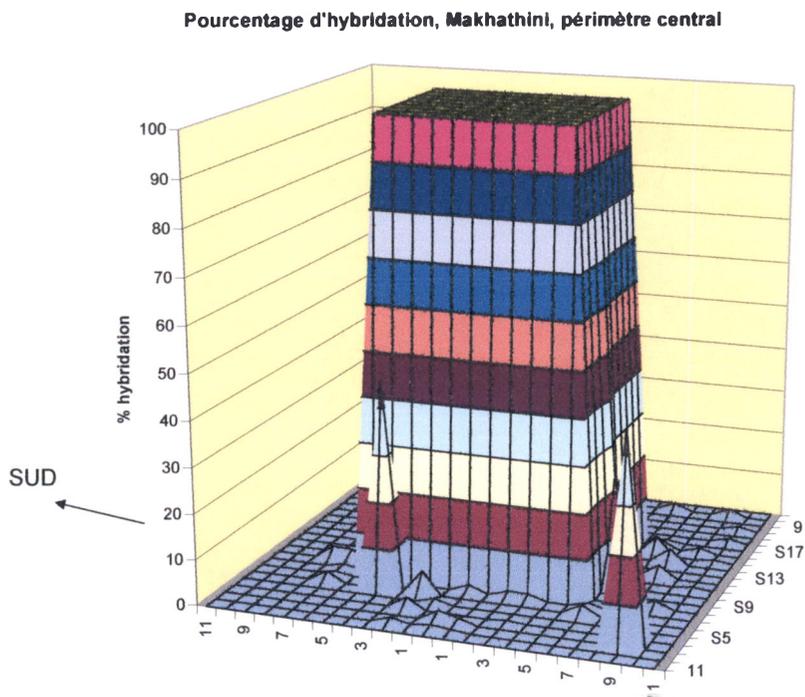


Figure 3-12 : Face ouest de l'essai de Makhathini, 2005, périmètre récepteur central (5 m).
 Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur position dans le champ.

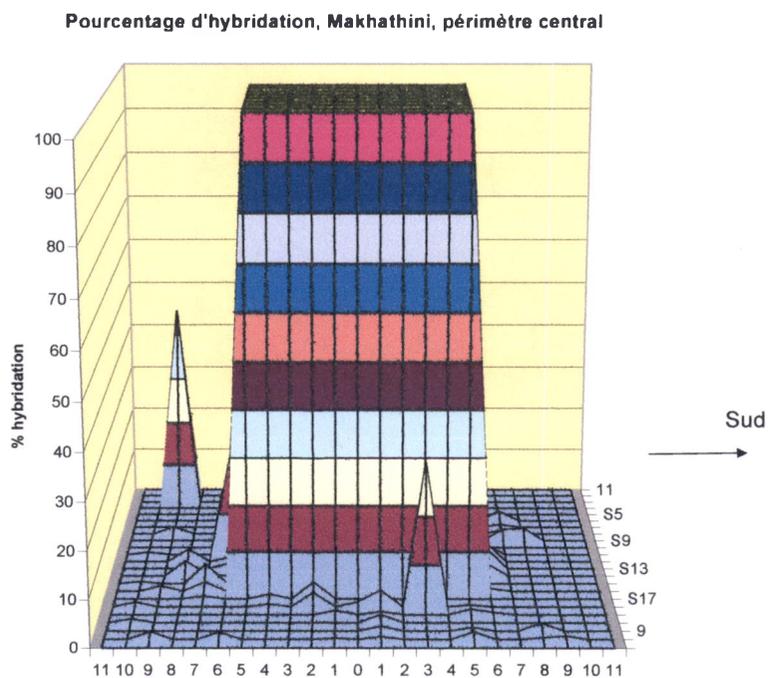


Figure 3-13 : Face sud de l'essai de Makhathini, 2005, périmètre récepteur extérieur (25 m).
 Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur position dans le champ. Parcelle émettrice et parcelle réceptrice centrale effacées.

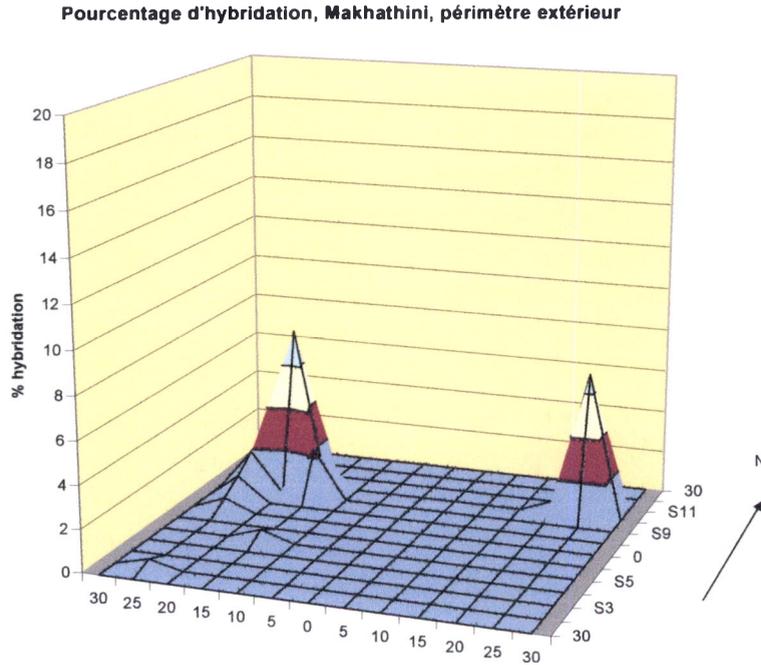
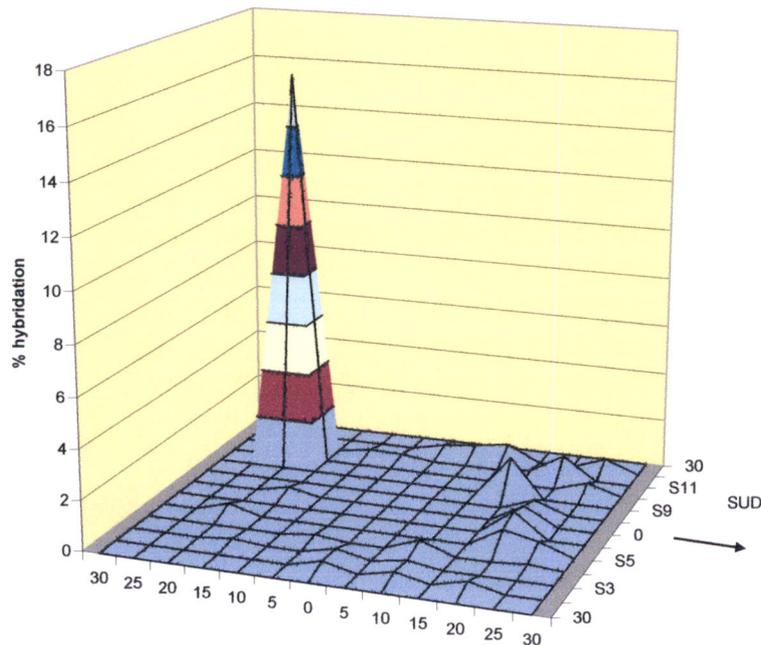


Figure 3-14 : Face ouest de l'essai de Makhathini, 2004, périmètre récepteur central (25 m).
 Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur position dans le champ. A comparer avec la Fig.3-13.

Pourcentage d'hybridation Rustenburg 2004/peuplement homogène (périmètre de 30m)



3 Essai de dispersion dans une population non homogène de cotonniers à Rustenburg

Nous avons précédemment étudié la dispersion du pollen dans une parcelle de taille relativement grande (1ha) ne présentant pas de discontinuité : le champ était uniformément occupé par un peuplement végétal ayant plus ou moins le même développement végétatif. Ces essais nous ont donné certains éléments de réponse en ce qui concerne les risques de dispersion. En pratique, le risque de dispersion concerne cependant d'autres cas de figure tels que les parcelles voisines séparées par un chemin, une friche ou une autre culture. Chaque configuration méritant une étude particulière, et possédant des moyens limités nous avons rédigé un protocole expérimental hybride réunissant deux parcellaires différents : une parcelle de coton centrale séparée d'une parcelle de coton par une bande de culture de tournesol et dans le second cas par une bande de terre labourée et entretenue.

Protocole expérimental

Comme dans les essais précédents, nous avons défini l'emplacement d'un capteur par rapport à sa « longitude » et sa « latitude », exprimée en mètre par rapport à la méridienne 0 (matérialisée par la ligne centrale verticale du plan parcellaire) et l'équateur (matérialisé par la ligne horizontale centrale du plan parcellaire).

Au centre d'un terrain d'un hectare (1 ha) une parcelle de coton de 10 m x 10 m, dite source, a été semée avec des graines d'un cultivar RoudUp Ready™ (Opal RR).

Une seconde variété (NuOpal) a été semée sur une largeur de 30 mètres à partir des deux bordures latérales orientées NO-SE, laissant un vide de 40 mètres dans la partie médiane du champ. Exprimé en terme de référentiel équateur/méridien propre à l'essai, ces bandes réceptrices se situent entre les méridiens 50 et 20 ouest et est. le vide est comblé par deux parcelles de 10 x 40 m de tournesol, symétriquement opposée par rapport au centre et semées à la même date. Ils sont délimités l'un par les méridien 15 et 5 ouest et par les parallèles 50 et 5 sud et l'autre par les méridien 15 et 5 est et par les parallèles 50 et 5 nord. La configuration du champ est présentée en figure 3-15. Le champ était situé à 1550 m de l'essai décrit dans le chapitre 1, distance que nous considérons suffisante pour ne pas interférer significativement sur les taux d'hybridation.

Les observations réalisées en cours de campagne sont les mêmes que celles décrites dans le chapitre 1.

Description des capteurs :

Dans les parcelles latérales les capteurs sont distants de 5 mètres dans 2 bandes de 25 mètres de large et 100 mètres de long, partant de l'extrémité du champ (ligne 50 à 25). Les capteurs sont composés de 9 plants. Dans les lignes des 20, 19, 18, 17 et 16 m, de part et d'autre de la ligne médiane du champ, les capteurs sont distants de 1m et correspondent à un plant.

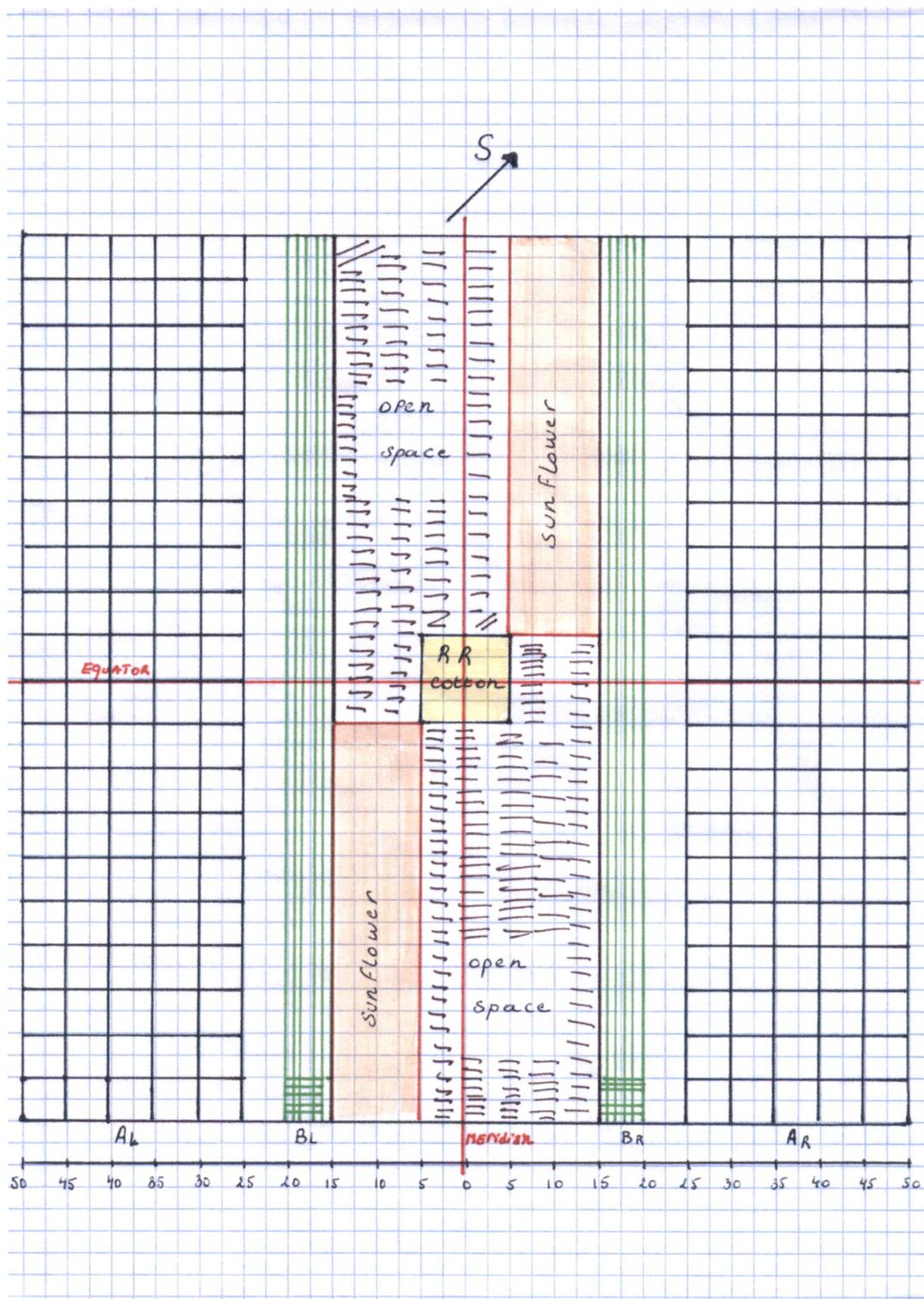
Remarque sur le développement végétatif

L'ensemble de la parcelle a subi des dommages dus à la grêle vers 45 JAS. Cet accident a retardé la floraison de plus de trois semaines. La partie émettrice ayant été affectée de façon similaire aux parties réceptrices, nous avons jugé bon de poursuivre l'essai en employant de fortes doses d'engrais pour relancer la production de branches fructifères.

Evaluation de la dispersion

L'évaluation de la fréquence de dispersion du pollen s'est faite de la même façon qu'au chapitre 1.

Figure 3-15 : Schéma de l'essai de dispersion dans un peuplement non homogène (Rustenburg)



Résultats

La dispersion du pollen (figures 3-16 et 3-17) s'est réalisée préférentiellement dans la zone située au nord/nord-est (CG) du champ (méridien 50 ouest [RC]), le long d'une zone arborée (*Cassia* et *Combretum*). Les fréquences d'hybridation varient fortement dans cette bande de 30 m de large (correspondant à une distance minimale de 20 m et maximale de 66 m de la source). Tout comme dans les essais précédents les fréquences maximales ne se rencontrent pas à proximité immédiate de la source : un pic de 41% est observé à 33 mètres de la plus proche bordure de la PE (25°N, 30°W). Une fréquence de 16% est reportée à 48 m (40°N, 35°W) et 4.8% a été détecté à 66 m (50°S, 50°W).

Dans la bande opposée, aucun croisement n'a été détecté au-delà du méridien 35°E (correspondant à des distances comprises entre 30 m et 66 m de la source). Le transport de pollen a été particulièrement actif dans le méridien 25°E pour lequel les pourcentages de descendants résistants sont relativement homogènes (12.4%). Au-delà de cette ligne, les résultats sont éparpillés. Le résultat le plus éloigné est une fréquence de 6.7% reportée à 35m (10°N, 40°E).

Dans les bandes contenant les capteurs de 1 plant (figure 3-18), à proximité de la PE (minimum 11 mètres et maximum 46 m), les fréquences varient entre 0 et 40%.

Afin de déceler d'éventuelles différences de fréquence selon la distance relative à la source et la présence ou l'absence d'une bande de tournesol, nous avons regroupé les fréquences en quatre groupes (partie 1 à 4). Leur répartition en fonction de la distance relative à la PE a été effectuée en pondérant la position de la ligne par l'éloignement du capteur par rapport au méridien 0 (figure 3-15).

Ainsi par exemple, se retrouvent sur la cote 20, les capteurs situés 1) sur la ligne des 16m sur l'axe situé à 20m du méridien 0 et 2) sur la ligne des 17 m sur l'axe situé à 10m du méridien 0.

Tableau 3-2 : fréquences d'hybridation moyennes dans les parties du champ.

Classement et regroupements des groupes non significativement différents après transformation $\sqrt{\quad}$

partie	Moyenne (ETm)	Regroupements
1 (tournesol)	2.793 (0.18)	A
2 (vide)	2.788 (0.20)	A
3 (tournesol)	2.652 (0.17)	A
4 (vide)	2.398 (0.15)	A

Tableau 3-3 : fréquences d'hybridation moyennes en fonction de l'éloignement de la source (1=proche/ 11 m, 14 = le plus éloigné/46m , incrément moyen= 3m).

Classement et regroupements des groupes non significativement différents après transformation $\sqrt{\quad}$

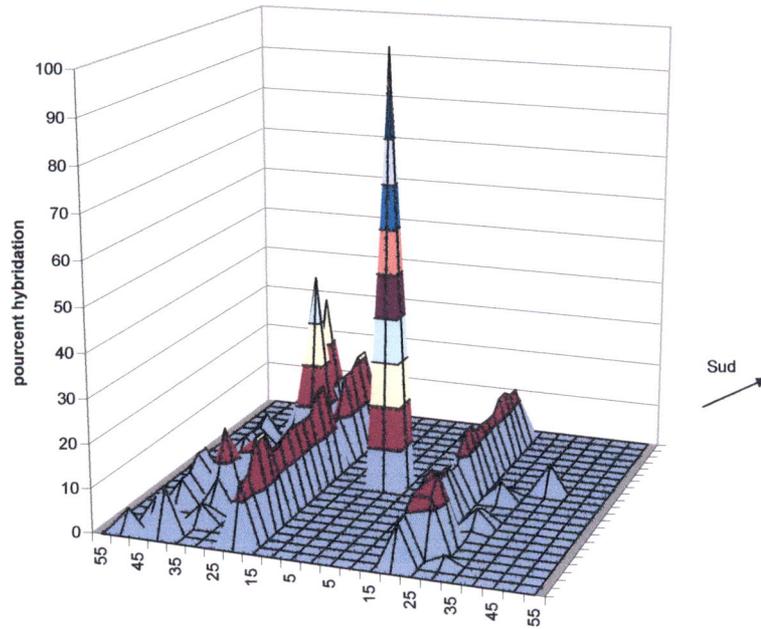
distance	Moyenne (ETm)	Regroupements
4	4.002 (0.28)	A
3	3.100 (0.13)	A
13	3.032 (0.32)	A
11	2.962 (0.25)	A
6	2.884 (0.05)	A
9	2.704 (0.36)	A
10	2.693 (0.08)	A
7	2.688 (0.11)	A
2	2.586 (0.34)	A
5	2.221(0.23)	A
1	2.179 (0.25)	A
12	2.157 (0.22)	A
14	2.093 (0.12)	A
8	1.905 (0.03)	A

L'analyse de la variance des données de fréquence transformées nous indique que pour un niveau $\alpha=0.05$, il n'est pas possible de déceler des différences significatives entre distance à la source et entre partie de champ (tableaux 3-2 et 3-3). Ce résultat suggère que les fréquences moyennes ne varient pas significativement dans une gamme de distances comprises entre 11 m et 46 m.

Sur les lignes de capteurs plus éloignés (lignes 25 à 50m) le résultat n'est pas plus contrasté : la présence de bandes de séparation n'affecte pas significativement les taux moyens d'hybridation ($1.14\% \pm 0.46$ en zone protégée et 1.72 ± 0.83 en zone dégagée).

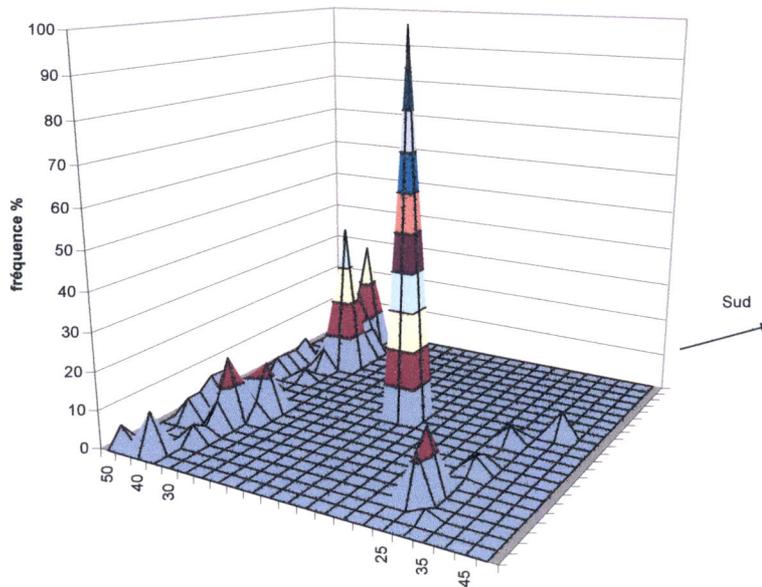
**Figure 3-16 : Essai de Rustenburg 2005, population hétérogène (vue d'ensemble).
Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur position dans le champ.**

Distribution de fréquence du taux de croisement naturel: population non homogène/ vue d'ensemble.



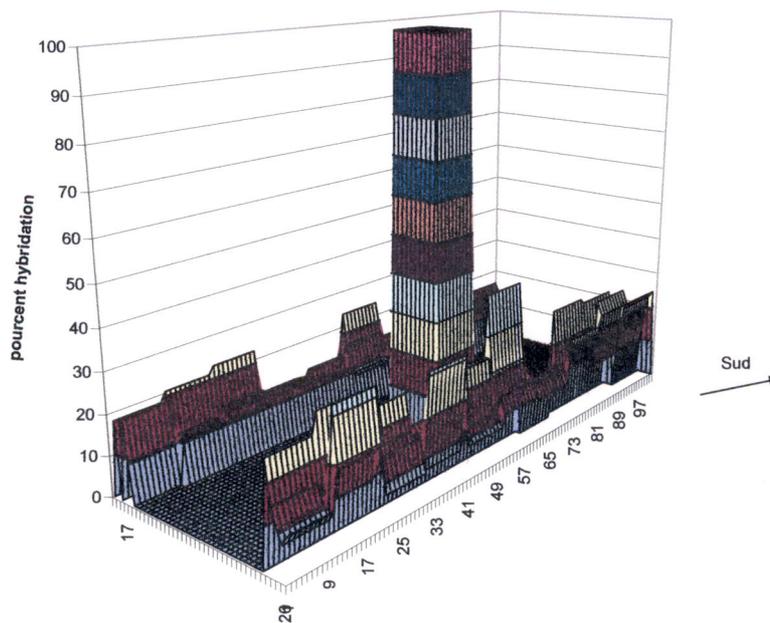
**Figure 3-17 : Essai de Rustenburg, 2005, population hétérogène, périmètre extérieur (50m).
Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur position dans le champ.**

Distribution de fréquence du taux de croisement naturel: population non homogène/ zone des 25-50 mètres de la source.



**Figure 3-18 : Essai de Rustenburg 2005, lignes latérales proches de la parcelle émettrice.
Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur position dans le champ.**

Distribution de fréquence du taux de croisement naturel: population non homogène/ zone des 16-20 mètres de la source.



Discussion

Les fréquences nulles observées dans la zone comprise entre 50° et 45° E (R.C.) ont deux causes : l'absence de semences viables à la récolte dans la zone sud (R.C.) et à l'absence de plants hybrides résistants dans la zone nord (R.C.).

Dans les conditions qui ont prévalu à Rustenburg, la présence d'une bande de séparation avec du tournesol n'a pas eu d'effet significatif sur la diminution du taux d'hybridation en comparaison avec une bande de terrain non cultivé de surface équivalente ; et cela quelque soit la distance à la PE.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature des résultats concernant l'utilisation du tournesol dans la composition des bandes d'isolement. Par contre, le maïs est fréquemment mentionné. Pope et al. (1944) ont comparé les fréquences d'hybridation chez le cotonnier séparé par une bande de la même espèce avec des bandes de maïs. Ils ont montré que, à distance égale, les bandes de séparation de maïs diminuaient les taux d'hybridation de 50% en moyenne. Cette réduction n'était pas rigoureusement proportionnelle à la largeur de la bande de séparation : la plus grande diminution se produisait lors du passage d'un dispositif de 3 à 6 lignes de maïs. Dans l'essai de Rustenburg, la bande de tournesol qui était relativement large (11 lignes) n'a pas eu d'effet réducteur. Ce constat pourrait être attribué à plusieurs raisons: 1) interférence de la zone boisée à l'ouest (RC) ; 2) attractivité du tournesol pour les abeilles et *Astylus* qui peuvent utiliser cette bande comme escale entre la PE et la zone réceptrice ; 3) inversement, si l'on considère la bande de séparation comme un « puis entomologique » où la culture d'isolement est plus attractive que le cotonnier, la plus courte période de floraison du tournesol et par conséquent la période d'attraction entomophile plus limitée dans le temps rend la barrière inefficace.

Approche globale de la dispersion

Nous scinderons la présentation en deux parties à l'égal de l'approche ponctuelle en discernant le périmètre proche de la source de pollen situé dans un rayon de 8 m à partir de la bordure et le périmètre éloigné comportant les capteurs distants d'au moins 10 m de la source. Rappelons que dans le premier cas, les capteurs étaient positionnés selon un maillage de 1 x 1 m autour de la PE. Dans le second, le maillage était plus lâche : 5 x 5 m ou 10 x 10 m.

1. Evaluation de la dispersion moyenne dans un périmètre proche de la source de pollen

Les données des essais de Rustenburg en 2004 et de Makhathini en 2005 ont pu être exploitées afin d'estimer l'évolution des fréquences moyennes d'hybridation dans un périmètre compris entre 6 et 13 mètres du centre de la PE, soit encore une zone distante de 1 à 8 mètres autour de la bordure « source ». Par souci de clarté **nous exprimerons les distances par rapport à la bordure de la parcelle émettrice**. Cette étude concerne uniquement les peuplements homogènes puisque l'implantation d'un peuplement hétérogène nécessite une rupture de continuité d'une largeur plus ou moins égale à celle de la PR (10 mètres).

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 3-4. Dans l'essai de Rustenburg, les fréquences moyennes observées dans les rayons de 1, 2 et 4 mètres sont significativement supérieurs à celle observée dans le rayon des 7 mètres.

A Makhathini, les fréquences moyennes observées dans les rayons de 5 et 4 mètres sont significativement inférieures à celles des rayons de 1 et 3 mètres et les valeurs obtenues dans le rayon de 1m sont supérieurs à celles rencontrées dans le rayon de 3 mètres. Il existe donc une diminution significative du taux d'hybridation entre la première ligne de cotonnier jouxtant la bordure de la source (à 1 m) et l'extérieur du périmètre (5 m).

Ces deux séries de données permettent aussi de réaliser une comparaison des taux dans deux environnements bien distincts ; Rustenburg hébergeant *Astylus atromaculatus* [Coleoptera : Meloidae] (voir chapitre 2) alors que Makhathini en est exempt.

A Makhathini, l'hybridation est maximale à 1 m de la source et sa valeur est supérieure (non significativement) à celle observée à Rustenburg. Pour les distances de 4, 5 et 6 m de la source de pollen, les fréquences notées à Rustenburg sont significativement supérieures à celles obtenues à Makhathini. Les moyennes générales n'ont pas pu être statistiquement différenciées et suggèrent que la pollinisation a été « en gros » similaire dans les deux régions.

Dans cet espace les courbes de fréquences du pollen (Figure 3-19), fonction de la distance à la source suivent une fonction polynomiale de troisième degré. La distribution des fréquences observées fait état d'une grande variabilité de la dispersion.

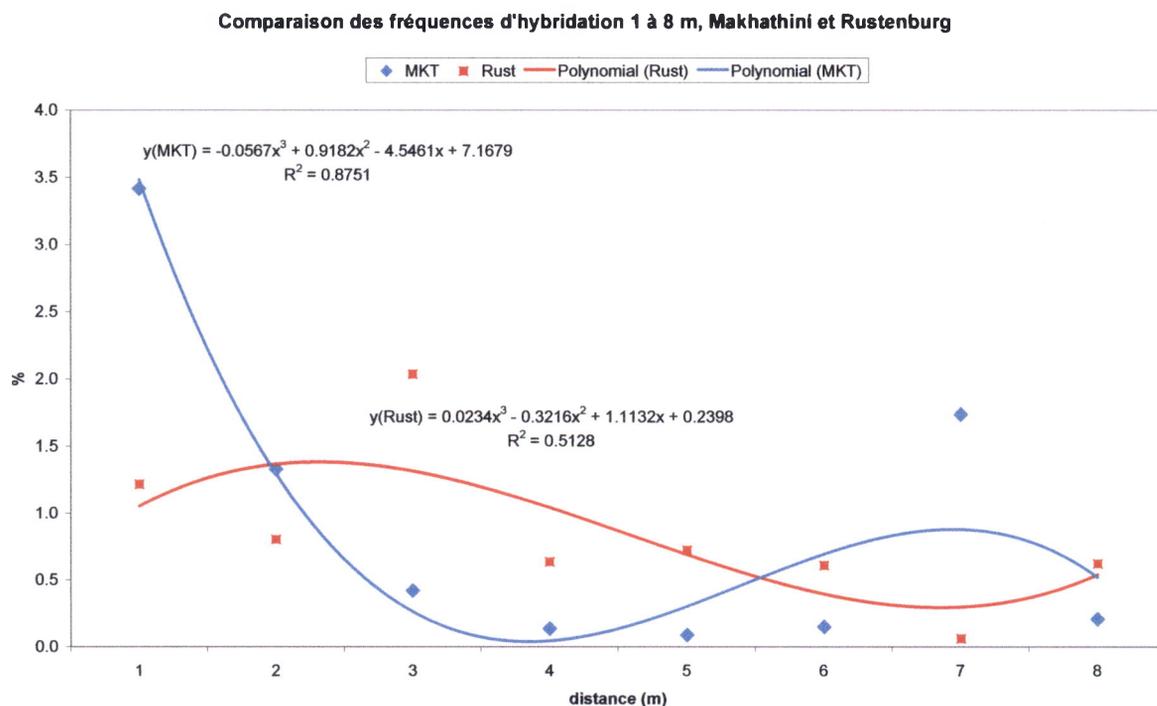
Tableau 3-4 : Fréquences moyennes d'hybridation en fonction de la distance à la source de pollen. Comparaison de l'essai de Rustenburg 2004 et Makhathini 2005. Périmètre 1-8 m de la source.

Distance (m)	Rustenburg 2004 % hybridation (ETM)			Makhathini 2005 % hybridation (ETM)	(1)			(2)
		(1)	(2)		5	4	3	
1	1.218 (0.411)	a		3.414 (1.322)	a	a	a	
2	0.802 (0.245)	a		1.329 (1.038)				
3	2.035 (1.122)			0.419 (0.126)	a	a	b	
4	0.635 (0.159)	a	a*	0.135 (0.065)		b		b
5	0.722 (0.221)		a**	0.081 (0.034)	b			b
6	0.608 (0.537)		a***	0.149 (0.085)				b
7	0.060 (0.042)	b		1.737 (1.625)				
8	0.622 (0.537)			0.206 (0.151)				
Moyenne	0.867 (0.190)			0.772 (0.240)				

(1) : différences intra essai ; (2) différences inter essai

Les valeurs présentant une lettre (a ou b) sont considérées comme significativement différentes par Test t, au niveau $\alpha=0.05$. * $t_{obs} = 2.917$, $ddl= 110$; ** $t_{obs} = 2.862$, $ddl= 136$; *** $t_{obs} = 2.082$, $ddl= 54$.

Figure 3-19 : Comparaison des fréquences moyennes d'hybridation dans un périmètre proche de la source de pollen : Rustenburg 2004 et Makhathini 2005
 Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur distance par rapport à la bordure de la parcelle émettrice.



2. Evaluation de la dispersion moyenne dans un périmètre éloigné de la source de pollen

La diversité des protocoles d'essais et leur situation géographique nous a permis de réaliser plusieurs comparaisons. L'évaluation des courbes de dispersion sur les distances moyennes a tenu compte des résultats obtenus dans les périmètres proches des sources de pollen afin d'établir une courbe prévisionnelle pouvant être considérée comme une courbe « modèle ». Ici encore, nous exprimerons les distances par rapport à la bordure de la parcelle émettrice.

2.1 Fréquences moyennes d'hybridation dans un peuplement homogène.

2.1.1 Essai de Rustenburg 2004

Dans le périmètre concerné par l'étude, la comparaison des fréquences moyennes d'hybridation n'indique pas distinctement de différences significatives en fonction de la distance de la PE. Une exception est cependant à signaler : la fréquence moyenne observée dans un rayon de 60 m de la PE est significativement inférieure à celles trouvées dans les rayons de 40, 35 et 10 m (tableau 3-5). La fonction de dispersion sera discutée au point 2.1.3.

Tableau 3-5 : Fréquences moyennes d'hybridation en fonction de la distance à la source de pollen. Comparaison de l'essai de Rustenburg 2004. Périmètre 10-60 m de la source.

Distance (m)	Rustenburg 2004 % hybridation (ETM)	Différences	t _{obs}	ddl
60	0.189 (0.189)	b		
55	0.015 (0.011)			
50	0.079 (0.037)			
45	0.069 (0.029)			
40	0.105 (0.026)	a	-2.392	82
35	0.138 (0.047)	a	-1.943	77
30	0.446 (0.246)			
25	0.602 (0.535)			
20	0.506 (0.400)			
15	0.186 (0.062)			
10	0.127 (0.083)	a	-2.976	49
Moyenne	0.224 (0.069)			

Les valeurs présentant une lettre (a ou b) sont considérées comme significativement différentes par Test t, au niveau $\alpha=0.05$.

2.1.2 Essai de Makhathini 2005

Les taux d'hybridation sont relativement faibles à Makhathini. La comparaison des fréquences moyennes des points de captage équidistants de la source (tableau 3-6) ne montre pas de différences significatives. Notons cependant que la fréquence observée à 30 mètres est relativement basse.

Tableau 3-6 : Fréquences moyennes d'hybridation en fonction de la distance à la source de pollen. Comparaison de l'essai de Makhathini 2005. Périmètre 10-30 m du centre de la source.

Distance (m)	Makhathini 2005 % hybridation (ETM)	Différences	t _{obs}	ddl
30	0.031 (0.031)	-	-	-
25	0	-	-	-
20	0.469 (0.256)	-	-	-
15	0	-	-	-
10	0.136 (0.67)	-	-	-
Moyenne	0.182 (0.88)	-	-	-

Les valeurs présentant une lettre (a ou b) sont considérées comme significativement différentes par Test t, au niveau $\alpha=0.05$.

2.1.3 Essai de Rustenburg 2005

Le dispositif expérimental de l'essai de Rustenburg étant particulier par son dispositif de maillage de capteurs 10 x10 m, les fréquences sont présentées dans le tableau 3-7 par plage de 10 mètres. La fréquence moyenne d'hybridation observée dans les abords immédiats de la parcelle émettrice est significativement supérieure aux taux rencontrés dans le reste du champ. Dans un rayon de 20 à 70 mètres, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les fréquences.

Tableau 3-7 : Fréquences moyennes d'hybridation en fonction de la distance à la source de pollen. Comparaison de l'essai de Rustenburg 2005. Périmètre 15-70 m du centre de la source.

Distance (m)	Moyenne	Ecart-type de la moyenne	Différences	t _{obs}	ddl
60-70	0.157	0.107	b	- 2.770	18
50-60	0.187	0.064	b	-4.764	45
40-50	0.174	0.072	b	-3.885	30
30-40	0.246	0.172	b	-3.053	26
20-30	0.414	0.240	b	-2.372	22
10-20	1.923	0.775	a		
Moyenne	0.339	0.081	-	-	-

2.1.4 Comparaison de trois essais : Makhathini 2005, Rustenburg 2004 et Rustenburg 2005.

Les résultats individuels des essais ont été présentés plus haut. Pour rendre la comparaison possible avec l'essai de Rustenburg 2005, les données des essais de Makhathini 2005 et Rustenburg 2004 ont été regroupées par incrément de 10 mètres au lieu de 5 mètres.

Les fréquences d'hybridation notées dans l'essai de Rustenburg 2005 sont significativement supérieures à celles des deux autres dans le périmètre des 10-20 m (tableau 3-8). Pour le reste, la comparaison des fréquences n'a pas donné lieu à des résultats significativement différents.

Tableau 3-8 : Fréquences moyennes d'hybridation dans le périmètre 10-20 m pour les 3 essais de dispersion en peuplement homogène.

essai	moyenne (ETM)	Différences	t _{obs}	ddl
Rustenburg 2005	1.923 (0.775)	a	-	-
Rustenburg 2004	0.127 (0.083)	b	3.639	26
Makhathini 2005	0.136 (0.113)	b	3.581	27

Les valeurs présentant une lettre (a ou b) sont considérées comme significativement différentes par Test t, au niveau $\alpha=0.05$.

L'analyse statistique des deux séries de données de Rustenburg 2004 et Rustenburg 2005 n'indique aucune différence significative dans les fréquences d'hybridation

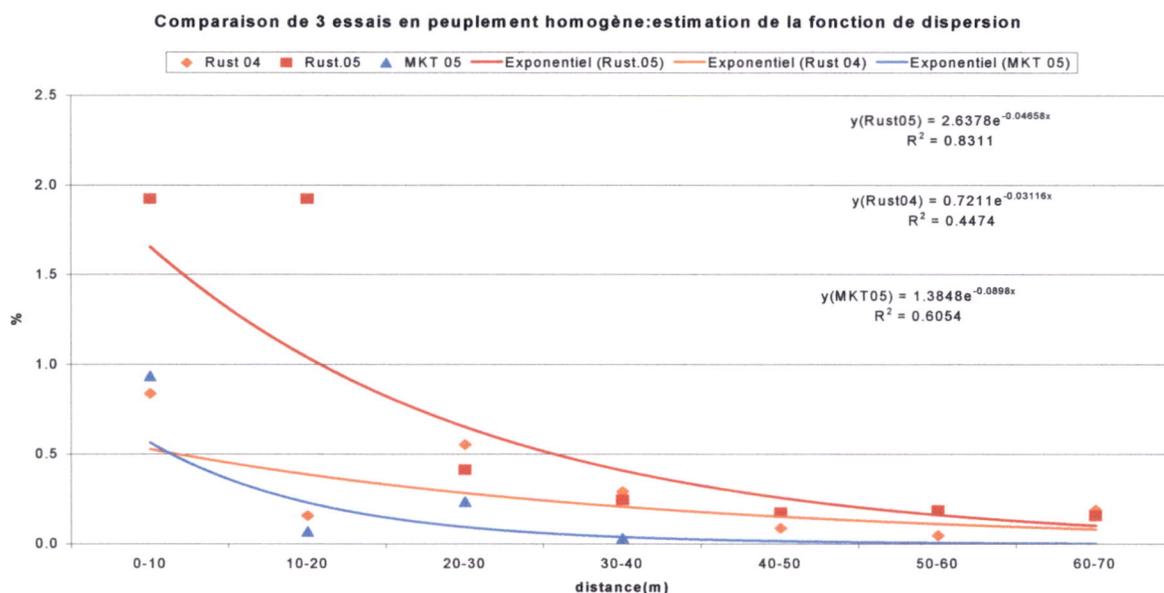
L'estimation de la dispersion par le calcul de courbes de tendances (Figure 3-21) confirme les résultats du point 2.1.4 et suggère que la dispersion du pollen à Makhathini s'effectue sur de moins longues distances qu'à Rustenburg.

L'estimation de la distance de la source pour laquelle le risque de dispersion du pollen peut être considéré nul (équivalent à $4 \cdot 10^{-2}$ %) donne une valeur de 40 m dans le cas de Makhathini et 90 m dans le cas de Rustenburg.

Les mêmes courbes nous renseignent aussi sur la distance au-delà de laquelle les fréquences d'hybridations sont inférieures à la norme de 0.9% adoptée par la CEE en matière de traçabilité des OGM. Les valeurs estimées sont assez différentes à Rustenburg d'une année à l'autre : en 2004, une distance de la source de 3 mètres aurait été suffisante pour obtenir un taux moyen inférieur au seuil imposé alors que l'année suivante une distance de 25 m aurait été nécessaire. A Makhathini, les données collectées durant une campagne nous permettent d'estimer le seuil à environ 5 m de la source.

Figure 3-21 : Comparaison et modélisation des fréquences moyennes d'hybridation dans un périmètre éloigné de la source de pollen : Rustenburg 2004 et 2005 et Makhathini 2005

Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur distance par rapport à la bordure de la parcelle émettrice.



2.2 Fréquences moyennes d'hybridation dans un peuplement hétérogène

2.2.1 Rayons contenant les capteurs à un plant (maillage 1 x 1 m)

L'estimation du taux d'hybridation dans les premières lignes de capteurs compris entre les méridiens 16 et 20 donne une valeur moyenne assez élevée : $14.0\% \pm 1.376$. Les capteurs à un plant situés dans cette zone couvrent un rayon de 50 m à partir du centre de la PE.

2.2.2 Rayons contenant les capteurs à 9 plants (maillage 5 x 5 m)

La fréquence moyenne d'hybridation de l'essai est élevée (tableau 3-9). Le test t permet d'établir des différences significatives entre la fréquence moyenne à 55 m et celles calculées à 40 et 35 m. Ces résultats laissent suggérer que la dispersion peut avoir des fréquences non négligeables jusqu'à 50 mètres de la source.

Tableau 3-9 : Fréquences moyennes d'hybridation en fonction de la distance à la source de pollen. Peuplement hétérogène.

Distance(m)	Moyenne	Ecart-type de la moyenne	Différences	t _{obs}	ddl
60	0.407	0.407			
55	0.607	0.434	b		
50	1.202	1.127			
45	1.163	0.423			
40	2.459	0.716	a	-2.080	61
35	2.531	0.845	a	-2.026	54
30	2.402	1.575			
25	0.811	0.811			
moyenne	1.543	0.301	-	-	-

2.3 Comparaison des fréquences de deux types de peuplement : Peuplement homogène et peuplement hétérogène.

Dans l'hypothèse de la similitude des effets causés par les bandes de tournesol et les bandes non cultivées, nous n'avons pas différencié les bandes de séparation par leur nature. Les données ont été analysées comme si les zones réceptrices étaient isolées de la PE par un seul type de discontinuité (sol nu par exemple).

Les fréquences moyennes d'hybridation dans un peuplement hétérogène de cotonnier sont supérieures à celles rencontrées à des distances identiques dans un peuplement homogène. Ces fréquences sont significativement supérieures dans les rayons de 35 à 45 m de la source (tableau 3-10).

Tableau 3-10 : Fréquences moyennes d'hybridation en fonction de la distance à la source de pollen. Comparaison de deux types de peuplement : homogène et hétérogène.

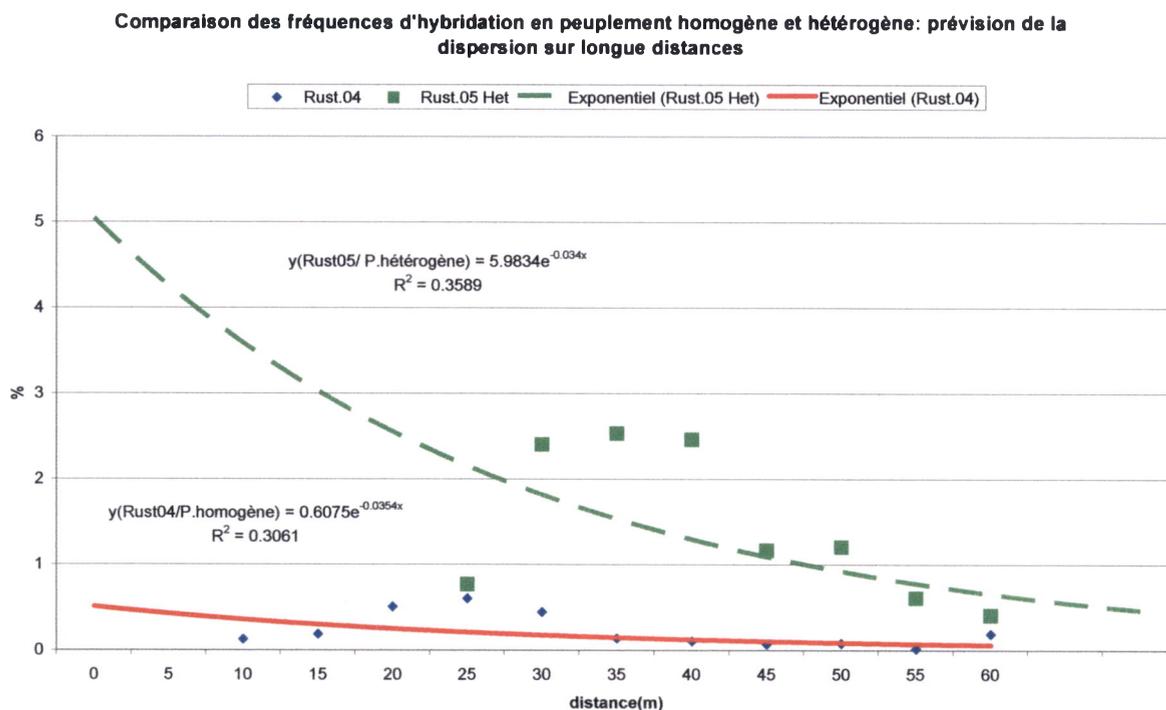
Distance (m)	Moyenne (ETm) Pop.	Différences	Moyenne (ETm) Pop.	Différences	t _{obs}	ddl
	Hétérogène		Homogène			
60	0.407 (0.407)		0.189 (0.189)			
55	0.607(0.434)		0.015 (0.011)			
50	1.202 (1.127)		0.079 (0.037)			
45	1.163 (0.423)	a	0.069 (0.029)	b	-2.997	124
40	2.459 (0.716)	a	0.105 (0.026)	b	-4.163	89
35	2.531 (0.845)	a	0.138 (0.047)	b	-3.823	77
30	2.402 (1.575)		0.446 (0.246)			
25	0.811 (0.811)		0.602 (0.535)			
Moyenne	1.543 (0.301)		0.224 (0.069)			

L'estimation des courbes de dispersion du pollen nous amène à penser que la dispersion se dissipe plus lentement dans un peuplement hétérogène (fig 3-22). Une simulation à partir des équations de courbe exponentielle montre que la dispersion du pollen dans un peuplement homogène tendrait vers 0 % (4.10^{-2}) d'hybridation à 80 m alors qu'un peuplement hétérogène composé d'une zone non occupée par du cotonnier tendrait vers le même seuil à 300 m.

Les fonctions de dispersion estimées sont respectivement pour le peuplement homogène (Rustenbug 2004) et le peuplement hétérogène :

- y (Rust04) = $5.9834 e^{-0.034x}$
- y (Rust05 hetero) = $0.607 e^{-0.0354x}$

Figure 3-22 : Comparaison et modélisation des fréquences moyennes d'hybridation dans deux types de peuplement : peuplement homogène (Rustenburg 2004) et peuplement hétérogène (Rustenburg 2005)
Proportion de plants résistants dans la descendance des plantes capteurs mâle fertiles en fonction de leur distance par rapport à la bordure de la parcelle émettrice.



Discussion générale et conclusion

Le calcul des fréquences et l'interprétation des résultats

Le poids des fréquences maximales, malgré leur faible nombre, influence fortement les valeurs moyennes présentées dans les tableaux 3-5 à 3-10. Cette tendance se ressent plus particulièrement dans les rayons de 20 à 40 m et engendre un saut de fréquence inexplicable. Ces accroissements pourraient être lissés par le calcul de moyennes pondérées, pour une distance donnée, par la somme des effectifs issus de chaque capteur. Les résultats pourraient aussi être complétés par le calcul d'un intervalle de confiance de la fréquence associé à chaque capteur.

L'effet de l'année

Les essais menés en peuplement homogène à Rustenburg durant deux saisons consécutives montrent la stabilité de la répartition spatiale des fréquences maximales. Par contre l'amplitude de ces fréquences peut varier considérablement d'une saison à l'autre. Ces variations sont probablement fonction de l'abondance des insectes visiteurs, des conditions climatiques, de la surface couverte par le capteur et de la densité du réseau de capteurs (maillage).

L'étude des fréquences moyennes d'hybridation indique qu'il peut avoir des différences inter-année pour une distance donnée dans un périmètre proche de la source de pollen. Pour les moyennes et longues distances (à partir de 20 m), les fréquences ne sont plus statistiquement différenciables d'une année à l'autre.

Dans les environnements choisis en RSA, la dispersion peut être fortement variable sur une courte distance. Les fréquences moyennes maximales sont généralement observées dans un périmètre situé entre 10 et 40 m de la source. Les fréquences moyennes décroissent rapidement à partir de ce point pour tendre vers 0% entre 80 et 90 m. Cette estimation de la limite de dispersion est comparable aux résultats de Brown (1919).

L'effet du milieu

La dispersion du pollen peut varier d'une région à l'autre. Notre étude montre que l'hybridation naturelle est de loin plus importante à Rustenburg qu'à Makhathini. Cette différence se situe sur deux plans : l'amplitude des fréquences et l'étendue ou intensité de la dispersion qui correspond au nombre de capteurs présentant des graines hybrides. La plus faible dispersion à Makhathini (surtout dans le périmètre des 25 m) pourrait être corrélée à l'absence de *Astylus atromaculatus* qui semble jouer un rôle actif dans la visitation des fleurs et dans le transport du pollen (chapitre II) à Rustenburg. Dans l'agrosystème de Makhathini, cet insecte n'est pas réellement substitué par une autre espèce : les autres Coléoptères *Meloidae* et *Meloidae* ne se rencontrent pas dans d'aussi grandes proportions. Cette différence dans la composition de l'entomofaune pourrait expliquer la tendance vers une diminution plus rapide des fréquences moyennes d'hybridation dans l'essai de Makhathini.

L'influence de la structure du peuplement

L'absence d'un périmètre de cotonnier à proximité immédiate de la source de pollen semble accroître la portée du flux de gène. Dans l'essai « population hétérogène » la bande de

séparation de terrain non occupé par le coton a eu un effet positif sur l'augmentation du flux de gène sur longue distance en comparaison avec les résultats obtenus dans les essais de « population homogène ». Dans le premier cas, les fréquences maximales sont inférieures à 17% au-delà d'une distance de 20 m de la source. Dans l'autre, en zone non protégée, des fréquences de l'ordre de 30 à 40% sont observées à plus de 30 m de la source. Ce constat est corroboré par les essais de Green et Jones (1953) qui ont démontré que les bandes de séparation composées de cotonnier étaient plus efficaces qu'une bande de sol nu dans la réduction des taux d'intercroisement.

Dans le cas des populations hétérogènes, les fréquences moyennes décroissent plus lentement en fonction de la distance qu'en population homogène. Bien que notre étude ne s'est limitée qu'à une seule distance de séparation de 10 m, nous supposons que 300 mètres sont nécessaires pour l'obtention d'un taux d'hybridation nul : ceci représente plus du triple de la distance requise en population homogène). Ce résultat aboutit à des conclusions assez distinctes de celles de Galal et al. (1972) qui préconisent que l'existence de fréquences élevées n'empêche pas leur rapide diminution en fonction de la distance. Dans les conditions de nos essais et en tenant compte de la directive sur la traçabilité des produits OGM de la CEE, l'existence d'un champ transgénique séparé de 10 m d'un champ conventionnel obligerait le propriétaire du champ labellisé « non OGM » d'éliminer une bande de 40m de large au voisinage de la culture transgénique. Au stade actuel de notre analyse, les résultats obtenus en Afrique du Sud démontrent qu'un isolement efficace passe par l'utilisation de bordure de cotonniers. Celles-ci, en fonction de la localisation du champ, peuvent varier entre 3 et 25 m de large pour l'obtention d'un taux d'impureté variétale de moins de 0.9%.

Dans certains cas particuliers, la dispersion peut dépasser nos estimations : Pope et al (1944) indiquent que la dispersion peut atteindre 1400 m dans le cas de parcelles séparées par du terrain non cultivé. La diminution des fréquences pourrait bien être freinée par l'existence d'espaces non cultivés autour du champ source.

L'analyse qui vient d'être réalisée a permis de donner un premier aperçu du phénomène de dispersion dans les champs de cotonnier. Les données pourraient cependant être traitées au moyen d'outils mathématiques mieux adaptés à l'approche modéliste de la dispersion. C'est ainsi qu'elles seront traitées au moyen :

- de l'analyse des fréquences pondérées en fonction des distances à la source ;
- du calcul d'intervalles de confiance associés à des proportions ;
- de l'analyse logistique en fonction du type d'essai ou des distances ;
- de l'estimation des fonctions de dispersion.

Ce travail pourra aboutir sur la modélisation de la dispersion du pollen de cotonnier en fonction de la structure du peuplement. Ces études complémentaires seront réalisées en 2006. Elles seront présentées dans le rapport final de projet destiné au Ministère de la Recherche et feront l'objet de publications scientifiques.

Références

Afzal M. and Khan, H. 1950. Natural crossing in cotton in western Punjab. *Agron. J.* 42, 14-19.; 89-93; 202-205; 236-238.

Brown H.B.1938. Cotton. Ed 2. 592pp. New York and London.

Chauhan D.S., Singh P, Singh P. 1983 . Isolation distance in upland cotton under Nagpur conditions. *Cotton Development* 13:23.

Elfawal M.A, Bishr M.A, Hassoub E.K. 1976. Naturalpollination in Egyptian cotton (*Gossypium barbadense* L.). *Journal of Agricultural Science* 86:205-209.

Fryxell, P. 1956. Effect of varietal mass on percentage of outcrossing in *Gossypium hirsutum* in New Mexico. *J. Hered.* 47, 299-301.

Galal H.E., Abou-el-fittouh H.A., Morshed G.1972 . Effect of direction and distance on cross pollination in Egyptian cotton (*Gossypium barbadense* L). *Experimental Agriculture* 8:67-71.

Green J.M., Jones M.D. 1953. Isolation of cotton for seed increase. *Agronomy Journal* 45: 366-368.

Gridley H.E.1974 . Natural and artificial crossing in upland cotton at Namolongu, Uganda. *Cotton Growing Review* 51:149-152.

Llewellyn D., Fitt G., 1996. Pollen dispersal from two trials of transgenic cotton in the Namoi Valley, Australia. *Molecular Breeding* 2:157-166.

Meredith WRJ, Bridge RR,1973 . Natural crossing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Crop Science*13:551-552.

Moresco E.R., Farias F.J.C., Aguiar P.H., Griodi-Papp I.I., Freire E.C., Marques M.F., de Souza M.C.1999. Determination of the rate of allogamy in herbaceous cotton in the cerrado of Mato Grosso, In *Anais II Congresso brasileiro de Algodao*. Riberao Preto, SP, Brasil, 603-604.

Mungomery V.E., Glassop A.J.1969. Natural cross-pollination of cotton in central Queensland. *Queensland Journal of Agriculture and Animal Sciences.* 26: 69-74.

Oosterhuis D.M., Jernstedt J.1999. Morphology and anatomy of the cotton plant. In WC Smith, JT Cothren, eds *Cotton: Origin, History, Technology and production*. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp 175-206.

Pope O.A., Simpson D.M., Duncan E.N. 1944. Effect of corn barriers on natural crossing in cotton. *Journal of Agric. Res.* 68 (9): 347-361.

Richmond T.R.1951 . Procedures and methods of cotton breeding with special reference to American cultivated species. *Advances in Genetics* 4:213-245.

- Simpson, D.M. 1954.** Natural cross-pollination in cotton. Tech. Bull. U.S. Dep. Agric. 1094.
- Smith W.C.1976 .** Natural cross-pollination of cotton. Arkansas Farm Research 25:6.
- Stephens, S.G. and Finkner, M.D. 1953.** Natural crossing in cotton. Econ. Bot. 7, 257-269.
- Theron C.C., Van Staden W.H.1975 .** Natuurlike kruis bestuiwing van katoen te Upington. Agroplantae 43:91-92.
- Thomson N.J.1966.** Cotton variety trials in the Ord Valley, North Western Australia. Natural crossing of cotton. Empire Cotton Growing Review. 43:18-21.
- Umbeck P.F, Barton K.A., Nordheim E.V., McCarty J.C., Parrot W.L., Jennings J.C. 1991.** Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. Journal of Economic Entomology 84:1943-1950.
- Xanthopoulos F.P., Kechagia U.E. 2000.** Natural crossing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Australian Journal of Agricultural Research 51(8): 979-983.

Annexes

Gossypium barbadense

Herbarium's name	Collection date	Herbarium references			Plant location	Comments
		Specimen reference		Collectors name		
		Reference N°	Grid N°			
National Herbarium Pretoria	1906	5020000			PP Rust, Mokopane, Limpopo	No relevant details
	1917	5020000			Soutspanberg	>>
	1965	5020000			Natal, Ubombo district, Mkuze	Cultivated
	03/1968	5020	2930DD	C.J. Ward		Aceas vegetation on old refuse dump, sandy soil. Locally frequent. Two specimens one in flower and another open bolls
	1993	5020000			Sesfontein (Namibia)	Cultivated
Department of Botany Herbarium University of Pretoria	14/07/1966	5020 (17044)		H.P.U.D.Schijff	B/n Hoedspruit and Bedford next to canal on cultivated lands	Cultivated cotton
	09/10/1993	5020 (1273)	1913DD	P. Van Wyk	Namibia, Sesfontein district at veterinary barrier, ± 1km south of Palmwagon road b/n Khorixas and Sesfontein (altitude 000615m)	Multi-stemmed tree, 4-5 m high, apparently evergreen flowers large, bright yellow turning red on wilting, fruit large, cone shaped.

Gossypium herbacem L. var Africanum

Herbarium's name	Collection date	Herbarium references		Collectors name	Plant location	Comments
		Specimen reference				
		Reference N°	Grid N°			
Department of Botany Herbarium University of Pretoria	02/03/1970	5020 (28430)	2431AD	R.N. Porter	Acomhoek, Timbavati Game Reserve, Peru, Limpopo province. (Altitude 1200m).	Rivervine habitat.
	15/01/1973	5020 (28005)	2229AB	Botany, Honours student, UP.	Waterpoort, distict of Messina, Lompopo Province.	Flood plain, sandy soil.
	08/01/1976	5020 (34383)	2431DA		Ripape, Manyaleti Game Reserve, Sarabankin the district of Pilgrinus Rest. (Altitude 1250m)	Bushveld.
	1976	5020 (38250)	2231 (CD)	N.Van Booyen	Pafuri, Kruger Wildtum, Kruger National park. (altitude 1650)	Savanna full sun, well drained sand soil.
	31/03/1979	5020 (38897)	2229DD	S.F. Fourie	Transvaal, Drichck farm	Savanna well drained sand soil. Hemicryptophyte. Flowers pale yellow with dark purple central eye. 70cm height.
	31/03/1979	5020 (38741)	2529AB	I. Schabort	Wolverdiend, Groblersdal, Mpumalanga. (Altitude 360)	Bushveld, well drained gravel.
	18/04/1979	5020 (40782)	2229DD	A.E.Van Wyk	Waterpoort, Vendaland, Northern part of Van Soutpansberg, Tshirrolwa	Bushy area, full sun. Well-drained sand loam soil.

Continued ... Gossypium herbacem L. var Africanum

Herbarium's name	Collection date	Herbarium references			Plant location	Comments
		Specimen references		Collectors name		
		Reference N°	Grid N°			
Department of Botany Herbarium University of Pretoria	22/05/1979	5020 (40027)	2429BD	M. Mathew	Zebediela. Potahe nature reserve, farm Winterveld, opposite to Chrome mine. (Altitude 810m).	Distributed on savanna full sun, eroded soil, dry riverbed; level slope.
	07/1987	5020 (56552)		E.J. DuPlessis	Kruger National Park, near Phalabarwa gate, in Limpopo.	
	01/04/1998	5020 (087175)	2430CA	S.J. Siebert	Steelpoort, Mpumalanga, Eastern chrome mines; part of mountain in the Winterveld area mine.	Mountain bushveld; well-drained red clay, stony soil; full sun facing, moderate slope, mountain foot vegetation; 2m height.
	00/04/2001	5020 (092343)	2632DC	L. Kellerman	Maputaland, Tembe Elephant Park, KuwaZulu Natal.	Woodland. Woody herb with woody seeds

ABELMOSCHUS ESCULENTUS

Herbarium's name	Collection date	Herbarium references			Plant location	Comments
		Specimen references		Collectors name		
		Reference N°	Grid N°			
National Herbarium Pretoria	1959				Natal ,	None
			2527DB		Magaliesberg (Roodeplaat)	Agric. trials

Pollen viability and longevity test of transgenic cotton (G. hirsutum L.)

CONTENTS

	Page
LIST OF TABLES	ii
LIST OF FIGURES.....	iii
1. Introduction.....	1
2. Materials and methods	2
2.1. Plant growth conditions	2
2.2. Pollen collection	3
2.3. Alexander staining	3
2.4. Tetrazolium chloride (TTC).....	3
2.5. In vitro germination test.....	4
2.6. Statistical analysis.....	4
3. Results and discussion.....	6
4. Conclusion.....	10
5. References	11
6. Appendix	12

LIST OF TABLES

	Page
Table 1: Composition and rate of the major and minor elements in hydro-grow fertilizer used to irrigate cotton plants	2
Table 2: The viability percentages of cotton pollen subjected at a period of time to TTC and in vitro germination methods	8

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1: Mature and non-mature pollen grains of cotton tested using Alexander staining method	5
Figure 2: The longevity of cotton pollen when subjected to TTC and in vitro germination test at 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 and 72-hour.....	6
Figure 3: Photos of viable and non-viable (and the light pink or colourless) cotton pollen grains stained using TTC at 6, 12, 24, 36, 48 and 72 hours after pollen collection.....	7
Figure 4: Photos of germinated cotton pollen grains using in vitro germination test at 0, 6, 12, 24, 36, 48 and 72-hour after pollen collection	9

1. Introduction

To assess the potential ecological impact of field or commercial releases of transgenic crops in a given region, the possibility and impact of vertical gene flow for that crop in that region should be taken into consideration (James, 2003). Concerns have been expressed that transgenic crops will hybridise with related species and result in the introgression of transgenes to weedy relatives. For transgenes conferring resistance to pests, diseases, and herbicides it is often suggested that this may result in enhanced fitness, survival and spread of weeds (Conner *et al.*, 2003). This may result in further invasion of natural habitats and compromise the biodiversity values of these habitats.

Gene flow can be through: a) pollen dispersal, b) dispersal of reproductive plant parts, such as seeds c) vegetative propagation. The main concern of gene flow is the transfer of pollen from transgenic cotton to wild relatives. The potential for a crop to hybridise with other relatives is highly dependent on sexual compatibility and relatedness between the parent species (Pretty, 2001). The natural hybridisation of crops with related plants was documented very early in plant science. These events occur where the distribution of a wild species overlaps with the cultivation of the related crop and are, especially common in the centres of diversity for specific crops (Conner *et al.*, 2003), similar to the case of South Africa.

Cotton (*Gossypium hirsutum*) is mainly a self-pollinating plant, but insects, especially bumblebees and honeybees, also routinely transfer pollen. The pollen is heavy and sticky and the range of natural crossing is limited. Insect prevalence strongly influences out-crossing rates for cotton and varies with location and time. The rates out crossing ranged from 5 to 50% depending on the insect population and decline rapidly with distance from the pollen source (McGregor, 1976). Given proximity and the availability of insects as pollen vectors, transgenic cotton lines 531, 757 and 1076 are likely to hybridize with other cotton varieties. The possibility of gene flow from *G. hirsutum* to *G. barbadense* was reported in Arizona (EVENT 15985).

Pollen viability is generally considered to indicate the ability of the pollen grain to perform its function of delivering the sperm cells to the embryo sac following compatible pollination. Pollen viability has been evaluated by various staining techniques (e.g., tetrazolium salts to detect dehydrogenase activity and fluorescein diacetate to determine esterase activity and the intactness of the plasma membrane), by *in vitro* and *in vivo* germination tests, or by analysing final seed set (Dafni, 1992).

Knowledge about the duration of pollen viability will be helpful in developing various methods to manage pollen flow. Barrow (1983) conducted pollen viability and longevity test on conventional cotton; and the crop used was non-transgenic cotton.

However, there have been no reports on pollen viability and longevity of transgenic pollen in transgenic cotton.

Therefore, the aim of this experiment was to investigate the viability and longevity of transgenic cotton. Hence, different staining methods namely Alexander and TTC and in vitro pollen germination were assessed at span of time.

2. Materials and methods

2.1. Plant growth conditions

In this study herbicide resistant, cotton (*G. hirsutum* L.) cultivar (Opal RR) was used. Cottonseeds were planted into plastic bags filled with growth media (sand and bark at ratio of 1:3 by volume) and were placed in a greenhouse with a mean temperature 25°C. The bags were irrigated daily with hydro-grow fertilized nutrient solution. It was prepared by mixing fertilizer with water at the rate of 1kg / 1000 litres of water and the composition major and minor elements can be seen from Table 1.

Table 1: Composition and rate of the major and minor elements in hydro-grow fertilizer used to irrigate cotton plants

Nutrient	Proportions (g/kg)	Nutrient	Proportions (mg/kg)
N	65	Fe	1680
P	45	Mn	400
K	240	B	500
Mg	30	Zn	200
S	60	Cu	30
Mo	50		

2.2. Pollen collection

Cotton pollen was collected when the flowers dehisced from 10:00 to 11:00am. The flowers were stored at room temperature and tests were conducted by taking pollen from the stored flowers. To determine pollen longevity, collected pollen grains were subjected to each method at 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 and 72 hours (a period of time until pollen lost viability completely) after the collection of flowers. To facilitate counting, a hand tally counter is used.

2.3. Alexander staining

This test was conducted as a preliminary to assess the maturity of pollen before conducting viability tests. The staining media was prepared by mixing 10 ml ethanol 35%, 10 mg malachite green (1 ml 1% of solution in 95% ethanol), 50 ml of distilled water, 25 ml glycerol, 5 g phenol, 5 g chloral hydrate, 50 mg fuchsin acid (5 ml of 1% solution in water), 5 mg orange G (0.5 ml of 1% solution in water) and 3 ml of glacial acetic acid (Dafni, 1992). The ingredients were mixed in order and the media was stored in a dark bottle at room temperature.

For this test, a drop of staining media was placed on each slide and pollen grains were dusted on each drop. The mounted sample slides were covered with a coverslip and incubated at 50°C for 24 hours. After incubation, the slides were observed using microscope with a magnification of 10x and video images was recorded. The mature pollen (stained yellow-red) and non-mature (green) were recorded and the percentage of mature pollen was calculated by counting the mature and the total amount of pollen subjected to staining.

2.4. Tetrazolium chloride (TTC)

This test was conducted according to (Barrow, 1983). The test solution consisted of a 2% concentration of the substrate 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) in 60% sucrose was prepared and was kept in dark bottle until needed. A drop of medium was placed in each slide and pollen was dispersed on the drop. The slides were covered with coverslip immediately to exclude oxygen and not to inhibit dye reduction. The slides were placed on wet petri dishes (moist filter paper) and were incubated at 50°C in a dark (Dafni, 1992). After 2 hours of incubation, the slides were observed under microscope on 10x. The pollen grain was considered viable if it turned deep pink. The percentage viability was calculated by counting the viable and the total amount of pollen placed for the test.

2.5. In vitro germination test

Pollen germination was determined in vitro according to Taylor (1972) with some modifications. The germination medium was prepared by adding, 100 ml of distilled water, 70 mg manganous sulphate ($Mn SO_4 \cdot 2H_2O$), 40 mg calcium nitrate [$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$], 40 mg boric acid (HBO_3), 40% of sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) and 3.5 g of agar. The

PH of the medium was brought to 7.6 before adding sucrose and agar. The medium was autoclaved at 15 pounds pressure for 15 minutes, and then was poured in to 3mm petri dishes. The petri dishes were cooled and stored at refrigerator. The petri dishes were removed from the refrigerator, and were placed at room temperature before the pollen was dusted. Dehisced pollen was dispersed uniformly on the surface of the medium on the petri dishes and incubated at 30°C. A 76% RH was attained using saturated NaCl. The petri dishes were then covered and incubated at 30°C in growth chamber for 6h. Pollen grains were counted for pollen germination using a microscope with a magnification of 10x, and a pollen grain was considered germinated when its tube pierced from pollen wall. Percentage of pollen germination was calculated by counting the total number of pollen grains, range of 50 to 200 pollen grains per replicate.

2.6. Statistical analysis

Each experiment was conducted as a complete randomised design with five replications. Data of pollen TTC viability and germination percentages were transformed using arcsine transformation and statistical analysed were carried out using the SAS statistical package, PC Version 8.0, SAS Institute, Cary, NC (SAS, 1999). The transformed data was used only to determine significance, but in all other comparisons the original data was used. LSD_{Tukey} (at $\alpha=0.05$) was calculated for determining significance among treatment means.

3. Results and discussion

According to Alexander's staining test the percentage of mature pollen was about 98.5%. Figure 1 shows the photo of mature (pink) and non-mature (green) pollen (Dafni, 1992). Based on this result, it was safe to conduct viability test, since with out doing the maturity test the percentage of viable pollen grains would be underestimated, i.e. if non-mature pollen collected before the right time the viability percentage might be lower.

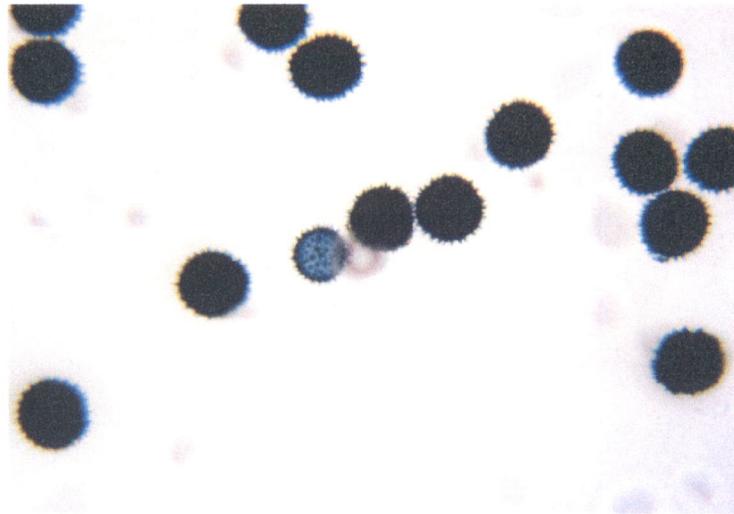


Figure 1: Mature and non-mature pollen grains of cotton tested using Alexander staining method

The highest viability of pollen was obtained at the time when the pollen grains start falling. These results were in agreement with Barrow (1981) who reported 98% viability when the anthers were collected right after the pollen started to dehisce. As a result, for the achievement of highest percentage of mature pollen the right time is when the pollen started to dehisce. Initially Alexander (1969) proposed this test as a method of viability for cotton, however, Barrow (1983) disproved this and he has reported no difference in percentage between cotton pollen grains treated with 43°C and untreated ones. Hence, the author recommended using this Alexander staining test as a test of maturity rather than viability. Pollen that has developed normally to anthesis can be distinguished from aborted grains that failed to mature due to various reasons. However, after maturity alive and dead pollen grains cannot be differentiated with this test (Barrow, 1983), even pollen from herbarium may stain positive (Dafni, 1992).

The raw data of viable and germinated pollen grains of cotton according to TTC is available in Table A1, while that of in vitro germination test is in Table A2, in the appendix. The initial percentage of TTC measure at 0-hour was 98% while out of these percentages only 61% were germinated using in vitro germination test (Figure 2). In both tests, the percentage decreased through time, and as the time extended to 48-hour the TTC percentage was reduced by 18% and in vitro germination by 55% (A1, in the appendix). There was drastic decrease in viability percentage from 48-hour up to 72-hour after anthesis. Thus, most of the pollen grains were not viable at 72 hours after anthesis. Aslam *et al.* (1964) found that TTC was effective in staining of

cotton pollen and the authors suggested as a promising test of cotton pollen. Barrow (1983) also reported good percentage of viability using TTC even though he didn't state the exact values.

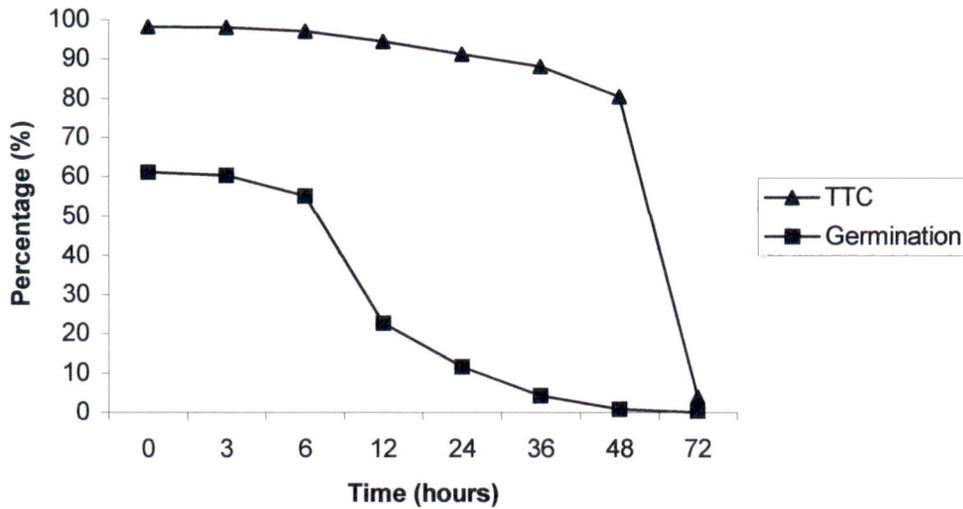
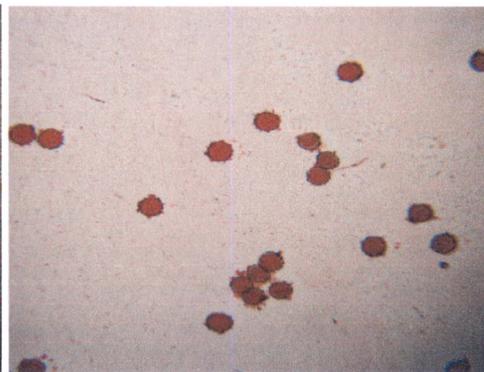
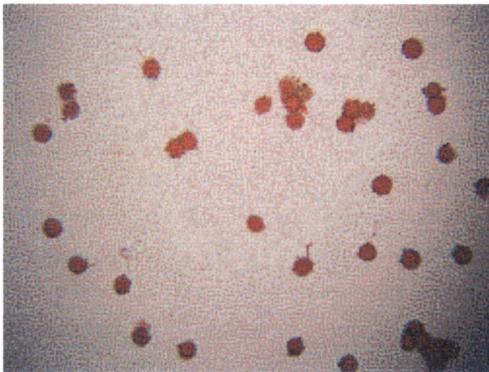


Figure 2: The longevity of cotton pollen when subjected to TTC and in vitro germination test at 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 and 72-hour

The viable pollen stained deep pink and non-viable light pink or colourless. The photos of viable and non-viable cotton pollen grains stained using TTC test at different times are shown in Figure 2. Since there was no difference in the staining among 0, 3 and 6-hours, only the pollen stained after 6-hours is presented (Figure 3).

6-hour

12-hour



24-hour

36-hour

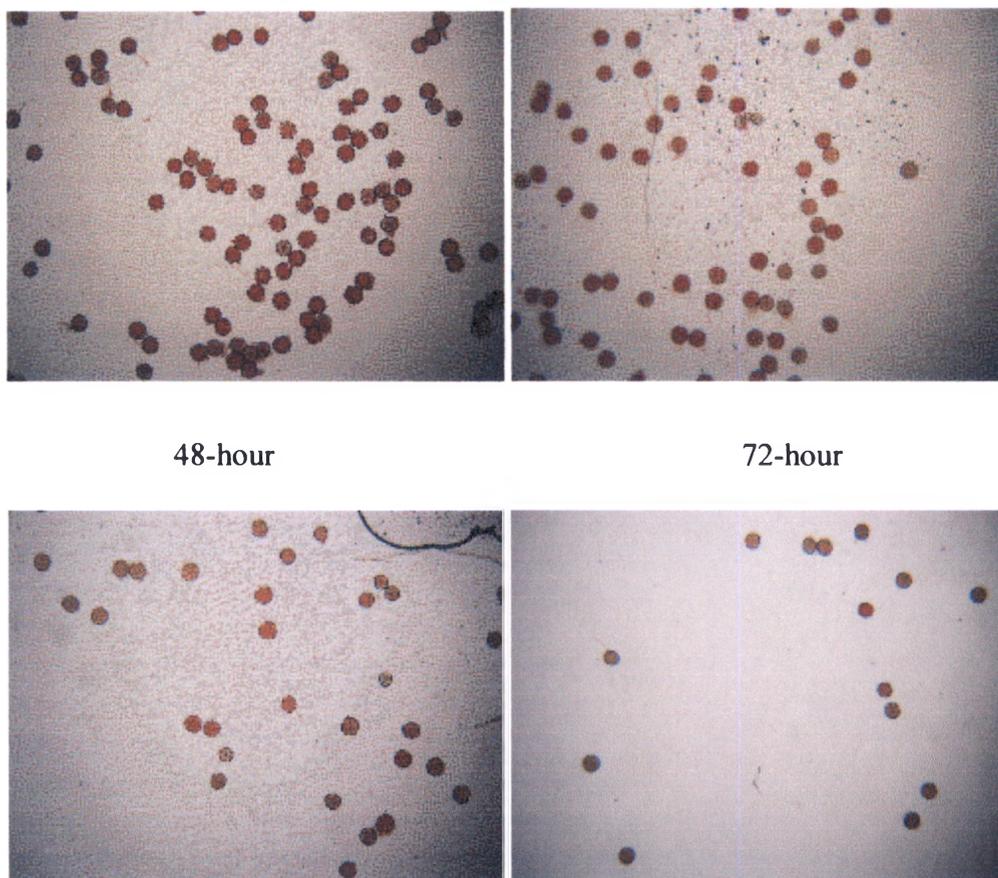


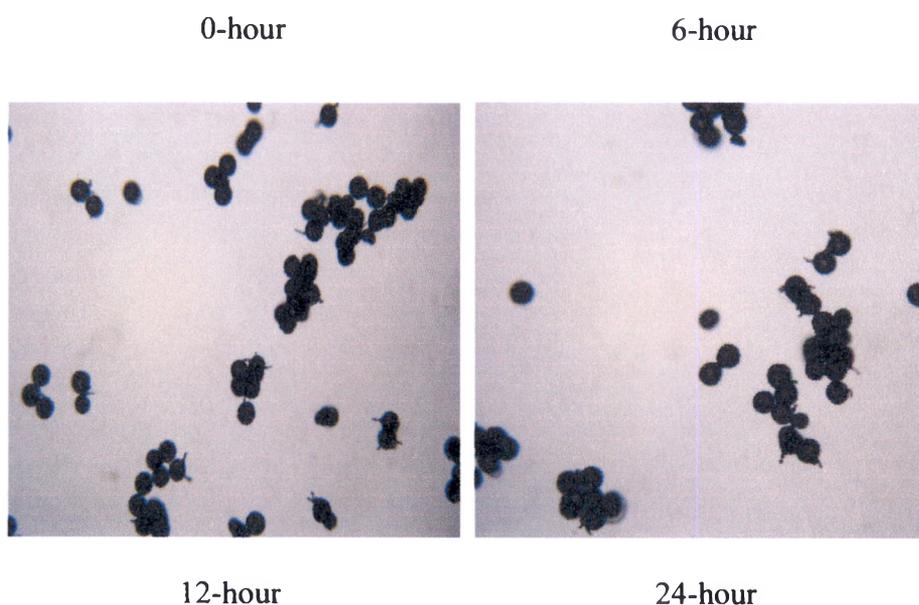
Figure 3: Photos of viable and non-viable (and the light pink or colourless) cotton pollen grains stained using TTC at 6, 12, 24, 36, 48 and 72 hours after pollen collection

ANOVA of TTC and in vitro germination are presented in tables A3 and A4, in the appendix. There was no significant difference in the percentage of viable pollen when pollen was stained using TTC up to 12-hour, while using in vitro germination the non-significant difference was only up to 6-hour (Table 2). This implies that pollen losses ability to germinate before losing its viability. Viability tells weather a pollen is alive or not, hence, a viable pollen does not mean it is necessarily to germinate. Barrow (1981) conducted experiment on longevity of cotton 2, 4, 8, 24 and 32-hour after anthesis using “hanging drop” method. He reported no difference up to 8-hour (above 98%), but germination was dropped to 30% after 24-hour and 1% after 36-hour. In the current result, however, the non-significant difference was observed only up to 8-hour. The difference could be due to cultivar, method used or the growing conditions of the mother plant.

Table 2: The viability percentages of cotton pollen subjected at a period of time to TTC and in vitro germination methods

Time (hours)	TTC (%)	Germmination (%)
0	98.20 [82.46]a	61.24[51.55]a
3	98.04 [82.14]a	60.42[51.07]a
6	98.12 [80.34]a	55.08[48.05]a
12	96.06 [78.66]a	22.72[28.28]b
24	91.12 [72.82]b	11.54[19.74]c
36	88.10 [69.9]b	4.28[11.65]d
48	80.50 [63.96]c	0.86[4.14]d
72	3.46 [10.08]d	-
Means	[67.55]	[30.64]
CV	[4.11]	[12.25]
F value	[377.55**]	[138.66**]
LSD _{Tukey}	[5.69]	[7.53]

The photos of germinated cotton pollen grains using in vitro germination test at different times are shown in Figure 4. In the current experiment, the initial in vitro germination was (0- hour) was 61%. Various authors reported range of percentage using different germination medium. Taylor (1972) reported an average of 34% *G. hisutum* using the same amount of agar and other salts used in this study, the only difference was that Taylor used 25% sucrose however in the current test 40% was used. Barrow (1981) 98% germination without agar using different salts, in a hang and drop method. The difference in percentage could be due to the use of different media and source of the pollen (transgenic or non-transgenic).



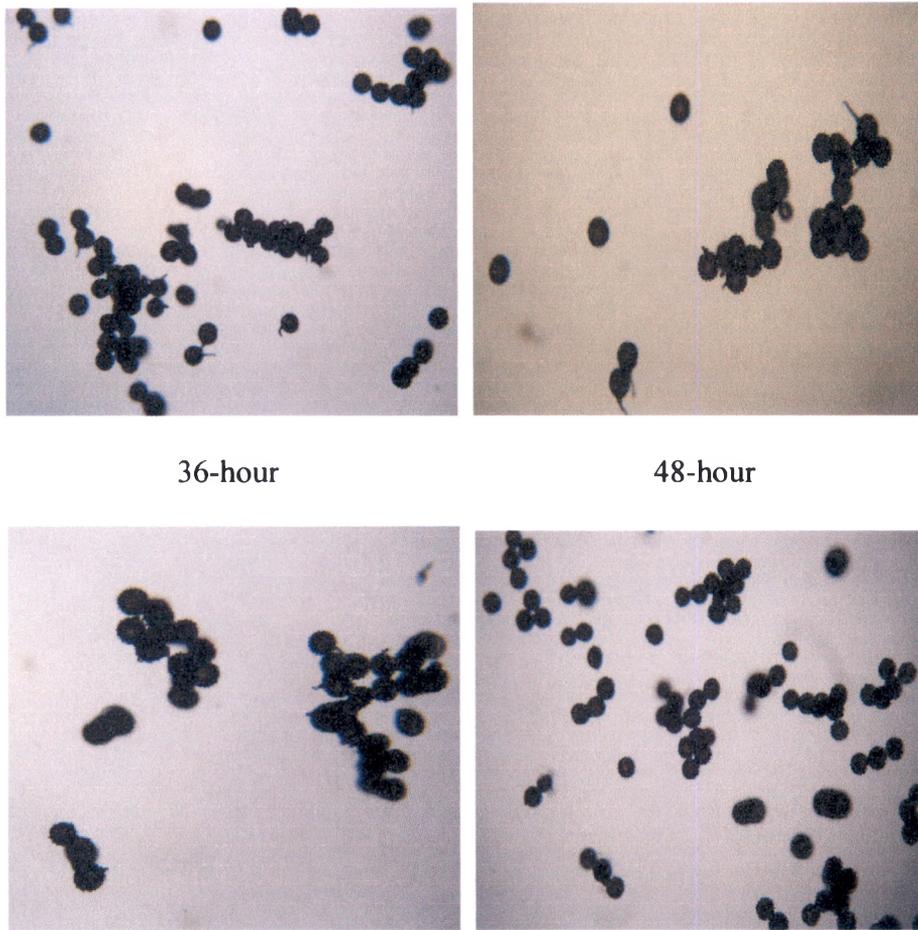


Figure 4: Photos of germinated cotton pollen grains using in vitro germination test at 0, 6, 12, 24, 36, 48 and 72-hour after pollen collection

4. Conclusion

Over 98% of the pollen was mature at the time when the pollen grains started to dehisce. According to the TTC staining the initial percentage viability was a 98% and the pollen stayed viable with out substantial reduction in percentage up to 48-hour, however, most of the pollen were not viable at 72-hour. The longevity of pollen using TTC and in vitro germination has similar pattern, and it decreased though time.

5. References

- ASLAM, M., BROWN, M.S. & KOHEL, R. J. 1964. Evaluation of seven tetrazolium salts as vital pollen stains in cotton *Gossypium hirsutum* L. *Crop Science*, 4:508-510.
- BARROW, J.R. 1981. A new concept in assessing cotton pollen germinability. *Crop Science*, 21:441-443.
- BARROW, J.R. 1983. Comparison among pollen viability measurement methods in cotton. *Crop Science*, 23:734-736.
- CONNER, A.J., GLARE, T.R. & NAP, J.P., 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *The Plant Journal*, 33, 19-46.
- DAFNI, A. 1992. *Pollination Ecology: The Practical Approach*. Oxford University Press.
- JAMES, C., 2003. International service for the acquisition of agri-biotech applications (ISAAA). Brief No. 27, ISAAA, Ithaca, NY.
- McGREGOR, S.E. 1976. Cotton. In *Insect pollination of cultivated crop plants*, Ed. Agricultural handbook No. 496. USDA, Agricultural Research Service, Washington, D. C., pp 171-190.
- PRETTY, J. 2001. The rapid emergence of genetic modification in world agriculture: contested risks and benefits. *Environmental Conservation*, 28:248-262.
- SAS, 1999. Property software release 8.2. SAS Institute Inc., NC, USA
- TAYLOR, R.M. 1972. Germination of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) pollen on an artificial medium. *Crop Science*, 12:243-244.

6. Appendix

Table A1: Raw data of viable pollen grains of cotton after staining with TTC test

Replication	0-hour			3-hour			6-hour			12-hour		
	Viable	Total	%	Viable	Total	%	Viable	Total	%	Viable	Total	%
1	213	220	96.82	145	147	98.64	137	142	96.48	203	213	95.31
2	170	173	98.27	169	174	97.13	159	162	98.15	186	194	95.88
3	136	138	98.55	218	220	99.09	193	197	97.97	137	141	97.16
4	183	186	98.39	177	180	98.33	221	228	96.93	213	219	97.26
5	182	184	98.91	134	138	97.1	195	203	96.06	174	184	94.57
Mean	176.8	180.2	98.19	168.6	171.8	98.06	181	186.4	97.12	182.6	190.2	96.03

Replication	24-hour			36-hour			48-hour			72-hour		
	Viable	Total	%									
1	82	95	86.32	176	205	85.85	116	134	86.57	4	173	2.31
2	126	137	91.97	132	143	92.31	142	171	83.04	3	182	1.65
3	71	77	92.23	147	170	86.47	123	147	83.67	9	102	8.82
4	68	75	90.67	122	136	89.71	113	154	73.38	4	125	3.2
5	186	197	94.42	173	201	86.07	75	99	75.76	2	148	1.35
Mean	106.6	116.2	91.12	150	171	88.08	113.8	141	80.48	4.4	146	3.471

Table A2: Raw data the germinated pollen grains of cotton after in vitro germination test

Replication	0-hour			3-hour			6-hour			12-hour		
	Germ	Total	%	Germ	Total	%	Germ	Total	%	Germ	Total	%
1	121	173	69.94	37	62	59.68	73	123	59.35	36	154	23.38
2	95	182	52.20	72	142	50.70	66	138	47.83	28	87	32.18
3	54	87	62.07	77	112	68.75	94	194	48.45	19	96	19.79
4	63	95	66.32	81	146	55.48	98	158	62.03	32	134	23.88
5	68	122	55.74	93	138	67.39	85	147	57.82	21	147	14.29
Mean	80.2	131.8	61.25	72	120	60.40	83.2	152	55.10	27.2	123.6	22.70

Replication	24-hour			36-hour			48-hour			72-hour		
	Germ	Total	%	Germ	Total	%	Germ	Total	%	Germ	Total	%
1	18	108	16.67	8	183	4.37	2	154	1.29	0	145	0
2	14	142	9.86	5	159	3.15	0	117	0	0	96	0
3	19	165	11.52	3	130	2.31	1	121	0.83	0	141	0
4	9	105	8.57	4	118	3.40	1	103	0.97	0	153	0
5	23	210	10.95	6	73	8.22	2	163	1.23	0	78	0
Mean	16.6	146	11.51	5.2	132.6	4.29	1.2	131.6	0.86	0	123.6	0

Table A3: ANOVA of viability percentage using TTC method at varying time

Source	DF	Mean square	F value	Pr >F	R ²	CV	Grand mean
Model	7	2907.98	337.27	<0.001	0.98	4.11	67.55
Error	32	7.71					
Corrected error	39						

Table A4: ANOVA of germination percentage using in vitro germination method at varying time

Source	DF	Mean square	F value	Pr >F	R ²	CV	Grand mean
Model	6	1954.47	138.66	<0.0001	0.97	12.25	30.64
Error	28	14.10					
Corrected error	34						

Pollen morphology of selected Malvaceae species

CONTENTS

	Page
LIST OF TABLES	ii
LIST OF FIGURES	iii
1. Introduction	1
2. Materials and methods	4
2.1. Pollen source.....	4
2.2. Ascetolysis.....	4
2.3. Scanning electron microscope	5
3. Results and discussion	7
4. Conclusion	12
5. References.....	13

LIST OF TABLES

	Page
Table 1: Measured pollen grain characteristics of <i>G. hirsutum</i> , <i>G. herbaceum</i> , <i>H. esculentus</i> , and <i>H. trionum</i> in μm from scanning electron micrograph.....	7

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1: Micrograph of pollen grain a) full size and apertures b) cross-section showing various parts.....	6
Figure 2: Micrograph of pollen gains of cultivated herbicide resistant cotton (<i>G. hirsutum</i>) a) single b) cross-section c) group of pollen grains.....	8
Figure 3: Micrograph of pollen gains of wild cotton (<i>G. herbaceum</i>) a) single b) cross-section c) group of pollen grains	9
Figure 4: Micrograph of pollen gains of cultivated okra (<i>H. esculentus</i>) a) single b) cross-section c) group of pollen grains	10
Figure 5: Micrograph of pollen gains of wild stockrose (<i>H. trionum</i>) a) single b) cross-section c) group of pollen grains	11

1. Introduction

The male gametophyte has a very complex structure that is reflective of that specific species functional adaptations. In the living pollen grains of an angiosperm where cotton belongs, the wall is made up of two layers; the outer (*exine*) and the inner (*intine*). The *exine* is composed of *sporopollenin*, with small quantities of polysaccharides. *Sporopollenin* is very chemically stable and it is resistant to almost all kinds of environmental damage. It is equipped with *apertures*. It is divided into an outer sculptured *sexine*, and an inner unsculptured *nexine*. The *sexine* has surfaces that are sculptured in elaborate ways, with reticulately arranged perforations. These give the *exine* granular appearance. The inner layer or *intine* is composed of cellulose and is very similar in construction to ordinary plant cell walls. A layer called the *endexine* separates the *sexine* and *intine* and it has a laminated appearance (Moore & Webb, 1978; Traverse, 1988).

Pollen grains are generally classified according to their physical appearance depending on the number and position of the apertures; and the fine elaborate structure on the *sexine*. Apertures are any thin or missing parts of the *exine*, which is independent of the pattern of the *exine*. There are two types of apertures: *pori* (pores) are mostly isodiametric holes, although they can be slightly elongated with rounded ends like that of cotton; *colpi* (furrows) are long and boat shaped with pointed ends. In living pollen grains, these apertures are not actually open. Instead, a very thin layer of *exine* covers them. If their apertures are arranged equidistantly around the equator of the pollen grains they are assigned the prefix *zono-*; if they are scattered all over the surface of the pollen grain they are assigned the prefix *panto-*. The number of apertures is also indicated by prefixes: *mono-* for one aperture; *di-* for two apertures; *tri-* for three apertures; and so on (Moore & Webb, 1978).

The sculpture refers to the fine structure and pattern of the *sexine*. The *sexine* has two parts the roof called *tectum* and small radially directed rods. If these rods support something (such as a plate or a small knob) they are called *columnellae*; if they do not support anything they are called *bacula*.

The dispersal of the pollen grains, there are two pollen features to take into account: the size and shape of the pollen grain and the fine structure of the *sexine*. The size of pollen grains indicates a lot about its dispersal methods. The fine structure of the *sexine* can also tell a lot about the methods of dispersal of pollen grains. The more elaborate the sculptures are, the more grip they provide for the attachment of the pollen grain to its pollinator. The sculpturing may provide for even more specific control over its method of pollination. Some sculptures may be adapted for a specific species of pollinator, such as a particular type of bee, beetle, bird, or bat. These exclusive relationships ensure that the pollen will not get wasted by being carried to the flower of a different species (Moore & Webb, 1978; Briggs & Brady, 2003).

To relate the morphological and structural features of pollen grains to their specific functions, structures such as apertures and sculpture of the *sexine* are likely to provide selective advantage to the species of plant. The pollen wall is responsible for the protection of the living reproductive cells during transport. The transport of pollen grains from the anther to the stigma of a flower requires a certain degree of mechanical stress. Hence, the wall of the pollen grain needs to be tough enough to withstand hydration and dehydration. Apertures need to be big enough to allow for the passage of the male gametophyte out of the pollen casing to the female gametophyte. Structures such as the *echinae* and other fine structures of the *sexine* serve as mechanisms for adhesion of the pollen grain to their pollinator (Traverse, 1988).

When a pollen grains fall on the stigma of another flower, the moist secretion that it encounters there stimulates it to produce pollen tube. For this to happen the pollen has to recognize itself within the vicinity of an ovule. Usually apertures provide the pollen grain with a medium for the recognition of protein signals so that it can develop a pollen tube that discharges sperm. There may be special pores provided for the emergence of the pollen tube, especially if the outer coat of the grain is thick, or the *exine* may simply rupture. The pollen tube penetrates the stigma and the style, finally reaching one of the ovules, where it discharges two male gametes and fertilization is effected (Traverse, 1988).

The family malvaceae is a cosmopolitan family of herbs, shrubs and trees, and is widely distributed in temperate and tropical zones. It is most famous for commercially cultivated cotton plant (Genus *Gossypium*) and several well-known garden shrubs (Heywood, 1993). Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is the world leading natural fibre and the second largest oilseed crop and belongs to this family. It is generally self-pollinating but outcrossing can occur in the presence of vectors. Cotton pollen is heavy and sticky; is not dispersed easily by wind (James, 2003), hence the range of natural crossing is limited.

Genetic variability can result from intervarietal crossing (among cultivars of cotton species), intraspecific (within cultivated and wild cotton species), interspecific (between cultivated cotton and indigenous South African *Gossypium* species or other species from other genera of the family Malvaceae). The natural crossing can occur where the distribution of a wild species overlaps with the GM cultivation of the related crop and are, especially common in the centres of diversity for specific crops, where hybrid swarms are often found. When considering the potential impact of gene transfer between GM crops and other species it is important to assess whether GM crops have any different capacity for gene transfer than their non-GM counterparts. Transgene introgression into wild species is often associated with hybridising ability.

Vertical gene flow (mainly through pollen) is the sexual transfer of genes between two genetic different entities, i.e. between two distinct populations or species (Kjellsson *et al.*, 1997). Gene flow occurs naturally, and crossing may happen among and closely related species. And undesirable traits may transfer from GM to wild plants. However, the probability lies on the specific crop. Gene transfer through cross-pollination can be limited by effective biological and physical barriers. Moreover, research has shown that there are physiological barriers operating that inhibit adoption of genes in wild species or populations. Gene transfer by pollen is possible only to those plants with the suitable chromosomal type and compatible (James, 2003).

The various forms of pollen grains, including variations in their shape, size, number and arrangement of apertures, and the fine sculpturing of their *sexine*, are adaptations to help the pollen grain better perform its function of fertilizing the female gametophytes and forming seeds that will give rise to new generations of plants. Therefore, the objective of this experiment was to study the various structures of

pollen grains of cotton and its relative species, which share the same geographical growing area as cotton. Four different species of malvaceae were studied and the micrographs of the different features of their pollen grain was observed and measured.

2. Materials and methods

2.1. Pollen source

Seeds of herbicide resistant cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*), wild cotton (*Gossypium herbaceum*), okra (*Hibiscus esculentus*) and wild stockrose (*Hibiscus trionum*) were used. Seeds of wild cotton, *H. trionum* and okra were collected from a place where transgenic cotton is growing commercially Maathini Flats, South Africa. Seeds of each species were planted into plastic bags filled with growth media (sand and bark at ratio of 1:3 by volume) and were placed in a greenhouse with a mean temperature 25°C. The bags were watered daily with nutrient solution. Flower buds were collected when the flowers started to dehisce and the pollen grains were dusted in poly-tubes, and were stored at refrigerator until the required amount were collected. The pollen grains of these species were studied using scanning electron microscope.

2.2. Ascetolysis

Ascetolysis of pollen grains was conducted to study the pollen morphology under scanning electron microscope. This method was used in order to remove debris and resume dehydrated and collapsed pollen to their original size (Coetzee, 1979). Ascetolysis dissolves all the pollen material with the exception of sporopollenin that forms the outer pollen wall, the *exine* (Dafni, 1997).

Flower buds were collected from the above species after anthesis and the pollen grains were dehisced and stored in poly-tubes with 90% of alcohol. The pollen grain samples were put in to tubes containing glacial acetic acid for 10 minutes. After centrifuging for 15 minutes at 2000xg, debris and supernatant were removed and discarded, the process was repeated for two times. The pollen samples were then treated with 10% of sulfuric acid (9:1 v/v). The tubes were heated gently to the boiling point in a water bath. After centrifuging, the ascetolysis mixture and other supernatant were carefully removed.

using a vacuum needle. The samples were suspended in glacial acetic acid, centrifuged and the water was poured. Finally, in order to remove all the mixture from the pollen, the samples were washed three times using distilled water, centrifuged and decanted (Yusuf, 1993).

2.3. Scanning electron microscope

For the scanning electron microscope, a drop of pollen was placed on a slide and was oven dried for 30 minutes. For the cross section, similar pollen grains were put in between two slides and were crushed by sliding and pressing the two slides with each other. From the slides the broken pollen grains were collected on the gold alloy. Moreover, for determining the size, number and length of apertures of the pollen, whole pollen grains were used as they are (Yusuf, 1979).

The scanning electron micrographs were printed and the structures of the different parts of pollen were measured on the prints and the measurements were in μm . The following pollen characteristics were measured and their detailed is provided in

- Pollen size (Figure 1a)
- Length and number of spines (Figure 1b)
- Whether the area around the spine is elevated (Figure 1b)
- The ratio of the cross section of tectum:baculi:nexine (Figure 1b)

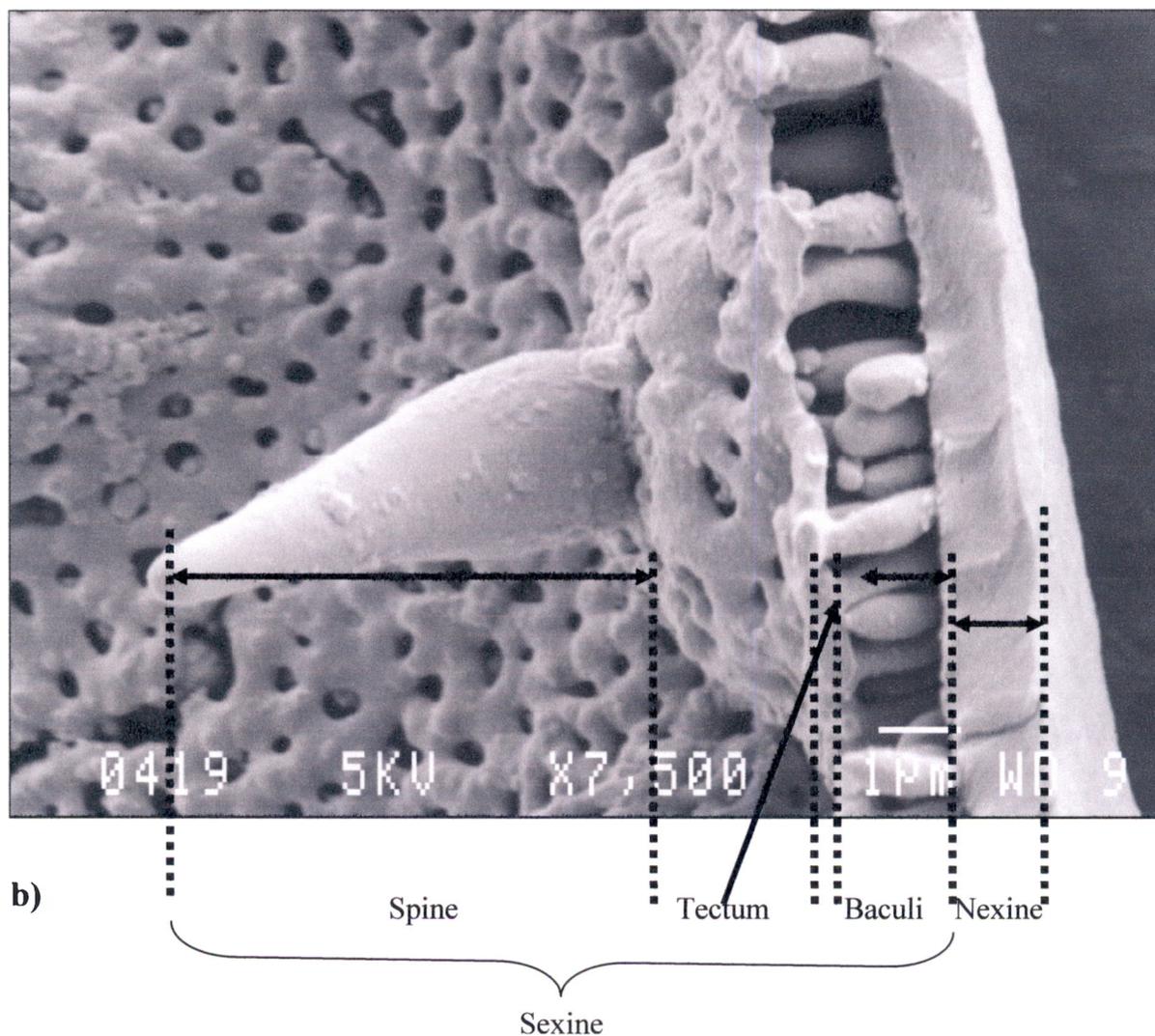
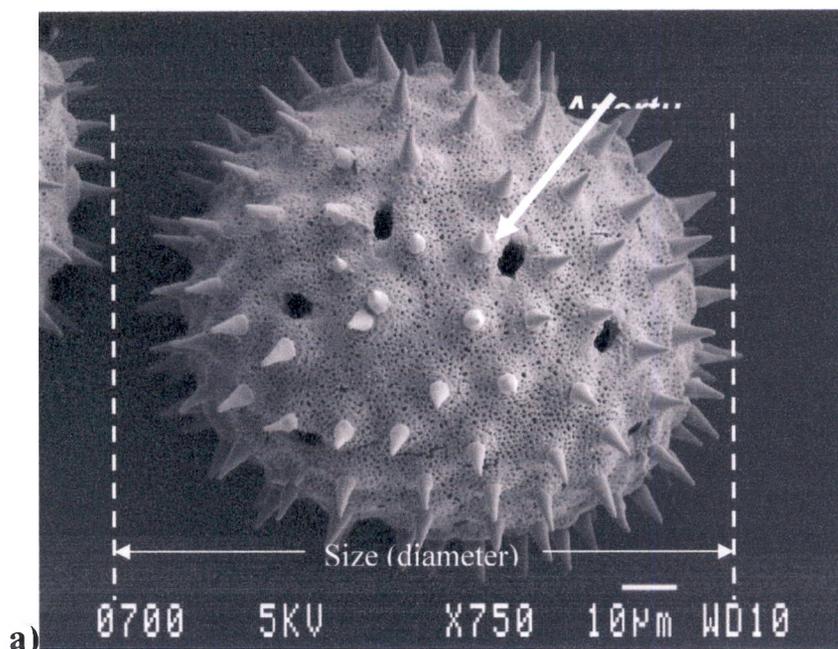


Figure 1: Micrograph of pollen grain a) full size and apertures b) cross-section showing various parts

3. Results and Discussion

The measured characteristics of scanning electron micrographs are presented in Table 1. The micrographs of the whole pollen grain and cross-section with different sections are illustrated in Figures 2, 3, 4 and 5 for *G. hirsutum*, *G. herbaceum*, *H. esculentus*, and *H. trionum* respectively. When the two genera were compared, the *Hibiscus* has greater pollen size, higher number and length of anertures, longer but fewer number of spines, and the area around the grain is not elevated (Table 1). The *tectum: baculi: nexine* ratio is not consistent, and it was difficult to compare as a

Table 1: Measured pollen grain characteristics of *G. hirsutum*, *G. herbaceum*, *H.*

Pollen		Gossypium		Hibiscus	
		<i>G. hirsutum</i>	<i>G. herbaceum</i>	<i>H. esculentus</i>	<i>H. trionum</i>
Size	Diameter	104-109	84-93	163-171	172-180
Spine	Length	6.2	6.7	20.8	19.4
	Number	144-152	192-214	114-118	94-98
	Ratio	~	~	~	~
	Nexine	1.05	1.74	1.83	2.91
Layers	Baculi	1.50	1.70	2.50	1.25
	Tectum	0.27	0.33	0.42	0.55
	Sexine:Nexine	2:1	1:1	1.5:1	1:1.5
	Tectum:baculi:nexine	3:4:1	5:6:1	4:6:1	6:3.5:1
Aperture	Number	12-16	10-14	26-28	46-48
	Length	6.2-6.6	5.5-7.4	10.3-12.7	8.7-9.6

Among the species investigated, there was significant difference in most features of the pollen. Similarly, Coetzee (1979) reported similar results in most characteristics, after studying the pollen morphology *G. herbaceum* and *H. trionum*. Except the

This might be due to source of the mother plant's geographical location. However, it

is difficult to ascertain whether or not differences relate to the source of seed's geographical location planted for pollen morphology study.

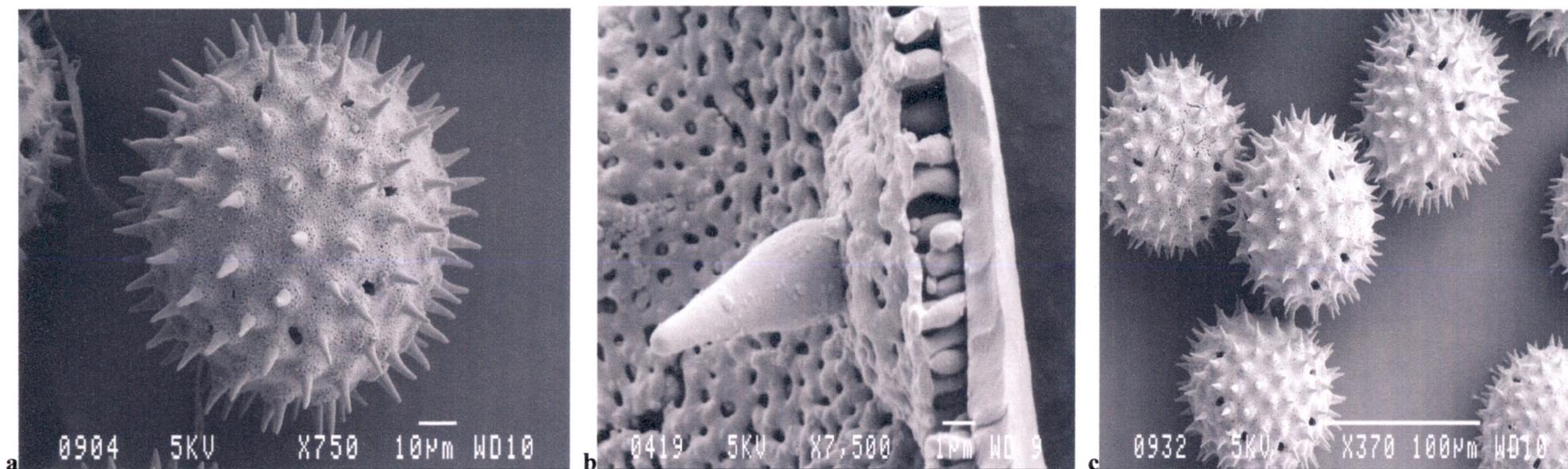


Figure 2: Micrograph of pollen grains of cultivated herbicide resistant cotton (*G. hirsutum*) a) single b) cross-section c) group of pollen grains

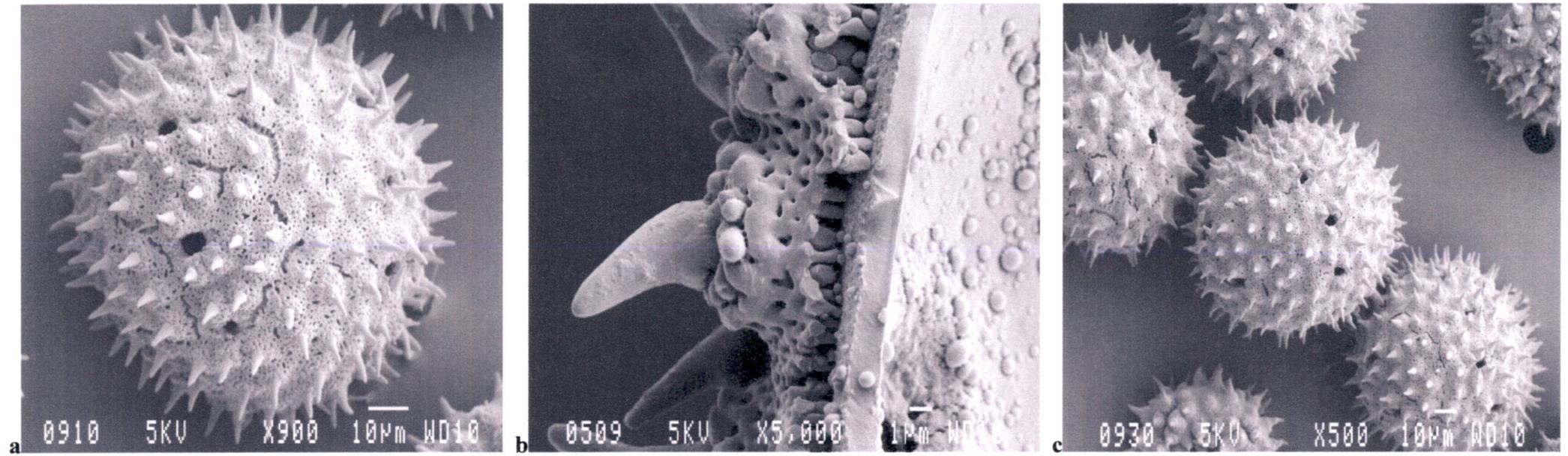


Figure 3: Micrograph of pollen grains of wild cotton (*G. herbaceum*) a) single b) cross-section c) group of pollen grains

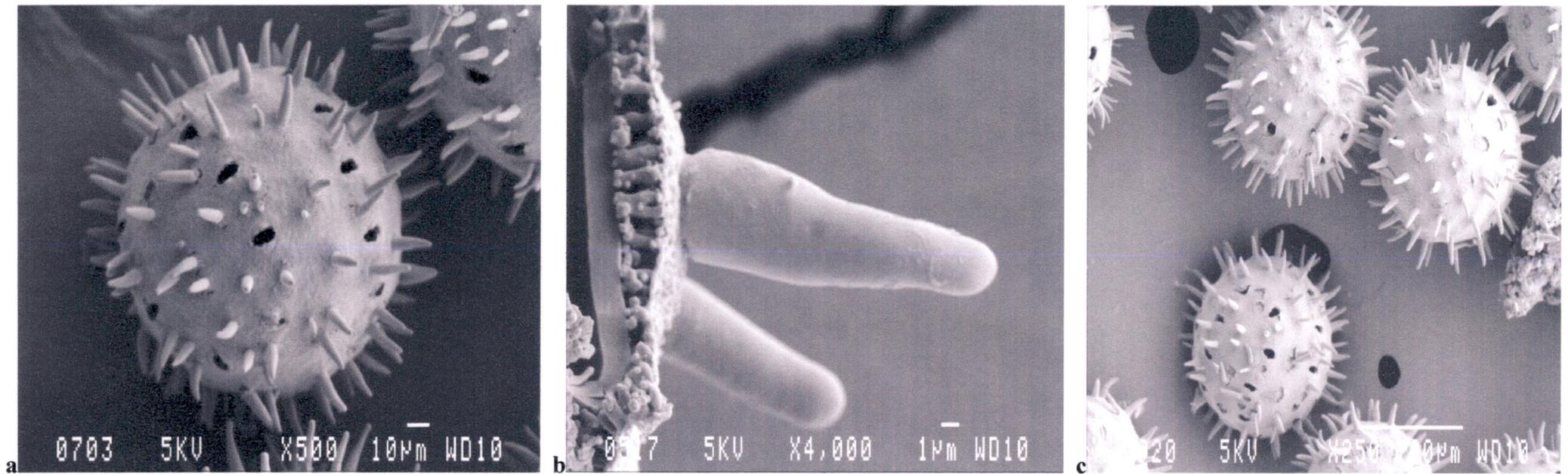


Figure 4: Micrograph of pollen grains of cultivated okra (*H. esculentus*) a) single b) cross-section c) group of pollen grains

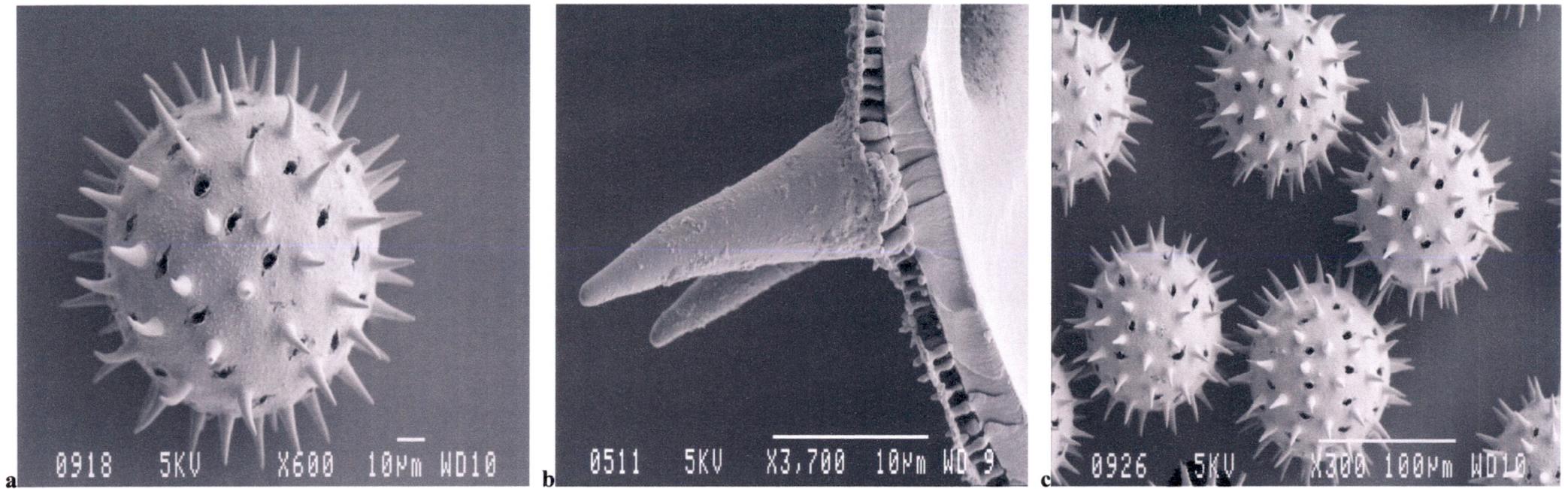


Figure 5: Micrograph of pollen gains of wild stockrose (*H. trionum*) a) single b) cross-section c) group of pollen grains

Gene flow from cultivated transgenic cotton to wild relatives of cotton may be possible, if they share a common geographical growing area. The RR pollen is similar to the wild cotton in most characteristics, both species have similar pollen size, spine number and length, aperture number and length, tectum: baculi: nexine ratio and the area around the spine is elevated. Therefore, there is higher opportunity of crossing between the cultivated and wild cotton. However, since the number and size of apertures are lower (Table 1; Figure 2 & 3), the rate of crossing may be low. Briggs & Brady, (2003) suggest that the more apertures and the bigger those apertures are, the greater the chance that that pollen grain will fertilize an egg. Apertures such as the ones shown in Figure 4 (*H. esculentus*) and Figure 5 (*H. trionum*) would provide the plant with greater chances for fertilization because they are found in many numbers. Equally, the size of the apertures would also provide its plant with a greater chance for fertilization to occur. Based on the features of pollen morphology crossing between *Gossypium hirsutum* and *H. trionum* could be limited since most of the parameters are not similar. However, the larger and bigger apertures of genus *Gossypium* might be helpful for detection.

Management systems such as spatial and temporal isolation can be used to minimise the risk of gene flow from transgenic cotton to wild relatives. The use of isolation zones, crop barrier rows and other vegetation barriers between transgenic cotton and wild relatives can be helpful in reducing the risk of gene flow. However, in area where the above barriers don't exist, the crossing habit of the plants can be helpful in risk assessment of transgenic cotton.

5. CONCLUSION

Before introducing transgenic cotton, better management systems to minimise gene flow require good scientific information on pollen-mediated gene flow. Studying the pollen morphology of the transgenic cotton and the wild relatives that grow in the same area may be used to investigate the possibility of crossing. Future knowledge of the pollination behaviour and ecology of the transgenic cotton and its

4. References

BRIGGS, D. & BRADY, J. 2004. Correlations Between the Structure and Function of Pollen Grains of Four Species of Angiosperms.

<http://www.science.smith.edu/departments/SEM/pages/ivelisse/sem.html> (May

COETZEE, J. 1978. Pollen morphology of South African Malvales: Characteristics

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0034425378900093>

93-126.

DAFNI, A. 1992. *Pollination Ecology: The Practical Approach*. Oxford University Press.

HEYWOOD, V.H. 1993. *Flowering Plants of the World*. Andronodia Oxford Ltd

JAMES, C. 2003. International service for the acquisition of agri-biotech applications

KJELLSSON, G., SIMONSEN, V. & AMMANN, K. 1997. *Methods of Risk*

MOORE, P.D. & WEBB, J. A. 1978. *Pollen Analysis*. Hodder and Stoughton.

TRAVERSE, A. 1988. *Paleopalynology*. Unwin Hyman, Boston, USA.