

L'attraction des femelles fécondées de lépidoptères ; une nouvelle voie de recherche pour la protection des plantes

Attraction des femelles de Pyrale

Ene Leppik (1), Centina Pinier (1), Jean-Baptiste Thibord (2) et Brigitte Frérot (1)

(1) INRA de Versailles, UMR 1392, IEES-Paris, RD 10, Route de Saint-Cyr, 78000 Versailles Cedex

(2) Arvalis - Institut du végétal, Agrosite de Pau- Montardon, Chemin de Pau, 64121 Montardon, France

brigitte.frerot@inra.fr

Résumé

Les insectes spécialistes ont co-évolué avec leurs plantes hôtes et développé des liens étroits qui passent par la reconnaissance olfactive de signaux chimiques de la plante. Des recherches ont été entreprises pour comprendre comment les signaux chimiques émis par le maïs agissent sur le comportement de la femelle fécondée de la pyrale du maïs, insecte ravageur du maïs. Dans le cadre du développement de nouvelles techniques de biocontrôle à base de médiateurs chimiques, il serait intéressant de pouvoir utiliser ces signaux pour contrôler les populations de femelles gravides. Une approche comportementale a démontré que les femelles fécondées de pyrale du maïs sont attirées par la plante hôte ; une approche physicochimique a abouti à l'identification des composés organiques volatils (COV) émis par la plante ; une approche électrophysiologique avec l'électroantennographie (EAG) a permis de trier les molécules perçues par les organes de l'olfaction.

Les résultats démontrent que pendant la période de ponte de l'insecte, le maïs produit un mélange précis de COV dont certains composants sont bien perçus par les antennes de la femelle gravis. Différents mélanges à base de composés de synthèse choisis en fonction des résultats des analyses et de l'EAG ont été testés en tunnel de vol pour évaluer l'attraction des femelles gravides. Un mélange s'est avéré aussi efficace que le maïs. Cependant des tests sur le terrain avec ce mélange n'ont pas permis de capturer les femelles fécondées, mais il a été observé qu'elles avaient tendance à pondre sur les maïs portant les diffuseurs. Les résultats sont discutés en tenant compte de la bibliographie récente et des différents paramètres à prendre en compte pour le futur : avoir un piège adapté au comportement de la Pyrale ; améliorer l'attractif pour qu'en conditions naturelles, il soit compétitif avec le maïs ; améliorer la diffusion de l'attractif.

Ces travaux appliqués à un cas type d'une relation plante – insecte spécifique renforce l'idée que les agro-messages pourraient être une des solutions à inclure dans les démarches de bio-contrôle.

Attraction of gravid female in Lepidoptera ; a new field of research for crop protection

Abstract

Specialized phytophagous insects coevolved with their host plant and developed close links that involved the olfactory recognition of chemical signals released by the host plants. Researches were undertaken to understand how the chemical signals released by the maize drive the host plant recognition and selection for oviposition by gravid females of the European corn borer. Considering the need for new biocontrol tools and the armfulness of the European corn borer, it arises that using semiochemicals for monitoring populations of gravid females will be of interest.

A behavioral approach demonstrated that gravid females of the European Corn Borer are attracted by the plant host; a physico-chemical approach ended in the identification of volatile organic compounds (COV) emitted by the plant; an electrophysiologic approach with the electroantennography (EAG) allowed to sort out molecules perceived by the organs of the olfaction

The results demonstrate that during the period of the insect oviposition, the maize released a precise mixture of COV whose certain components are well perceived by the gravid female. Mixtures of synthetic compounds were tested in flight tunnel to determine their capacity to attract the gravid females. A mixture was as effective as the maize.

However, tests in the field with this mixture did not allow to capture the mated females, but it was observed that they tended to lay more on the maize carrying the dispensers. The researches are discussed by taking into account the recent bibliography and the various parameters important for future: the need of a trap adapted to the insect behavior; improvement of the attractant to be competitive with the plants under field conditions; improvement of the release rate of the attractant.

These works applied to a typical case of a specific relation between plant and insect strengthens the idea that agro-messages could be one of the solutions to be included in the bio-control.

INTRODUCTION

Toutes les plantes vasculaires, y compris le maïs (*Zea mays*), émettent des composés organiques volatils (COV), qui sont des métabolites secondaires (Dudareva *et al.* 2000). Chaque biotope, chaque parcelle cultivée émet un mélange de COV spécifiques constituant un paysage chimique original (Leppik *et al.* 2014 a) caractéristique de ce biotope. Les insectes herbivores qui ont co-évolué avec les plantes (Schoonhoven *et al.* 2005) utilisent les signatures chimiques constituées d'un assemblage spécifique de COV pour reconnaître leur plante-hôte (Beyaert *et al.* 2014). La pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera, Crambidae) est le principal ravageur du maïs de l'hémisphère nord. Les études du comportement ont montré, que les femelles utilisent des signaux chimiques pour localiser et discriminer la plante-hôte (Leppik *et al.* 2012). Les Pyrales adultes ne restent pas dans le champ de maïs après la mue imaginale, mais se réfugient dans des zones herbacées et humides où elles s'accouplent (Showers *et al.* 1976). Au crépuscule, seules les femelles fécondées retournent vers le champ de maïs pour y pondre. A côté des phéromones sexuelles qui sont utilisées pour la surveillance des vols du ravageur, l'utilisation des COV pour contrôler les populations des ravageurs, est un domaine qui peut présenter une forte potentialité. Dans le cadre du développement de nouvelles techniques de biocontrôle à base de médiateurs chimiques, nous avons identifié les odeurs impliquées dans la reconnaissance de la plante-hôte par les femelles gravides; étudié la détection des composés identifiés par électroantennographie (EAG); reconstitué un mélange attractif en tunnel de vol. Les résultats de cette étude sont présentés et discutés dans la perspective d'une application pour maîtriser les populations de la pyrale. La récente publication de Molnár *et al.*, 2015 est aussi discutée ainsi que les perspectives.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Prélèvement des odeurs

1.1.1. Prélèvements des COV du maïs

Les COV sont prélevés dans l'espace de tête ou (50 x 30 cm) d'un maïs cultivé au champ, au stade 4 feuilles (Grignon, Yvelines, France) (48° 85' N, 1° 68' E) sur la variété Troubadour, pendant 2 heures le jour et en début de nuit soit de 13 :00-15 :00 et 22 :00-00 :00 (Figure 1).

1.2. Analyse des COV

1.2.1. Les fibres SPME

Les fibres SPME (Solide Phase Micro Extraction) utilisées sont des Divinylbenzene/ Carboxen/ Polydiméthylsiloxane (DVB/CAR/PDMS- 50/30 µm. Supelco).

1.2.2. Les analyses chimiques des COV

Les fibres sont désorbées dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse (Sciex 436) couplé au détecteur masse simple quad SQ TM (Bruker). Les COV sont séparés sur une colonne Rxi-5ms (Restek, France) 30 m x 0,32 mm I.D., épaisseur de film 0,5 µm. Le four de la colonne est programmé de 50°C à 300°C par pas de 8°C/minute avec l'hélium comme gaz vecteur.

Les spectres de masse sont obtenus en mode impact électronique (70 eV).

Les COV sont identifiés grâce à leurs spectres de masse et leurs indices de rétention (RI). Les spectres des composés élués et les RI sont comparés à ceux de la bibliothèque du laboratoire et de la bibliothèque NIST 2011.

1.3. Etude électrophysiologique de la perception des odeurs par la pyrale

Les enregistrements EAG (Electroantennographie) ont été effectués à température ambiante sur les Pyrales âgés de 3 à 4 jours selon la méthode décrite par Renou *et al.* (1986) (Figure 2). L'analyse des réponses EAG est effectuée à l'aide du logiciel pClamp 10 (Molecular Devices). Les composés de synthèse ont été obtenus en majorité chez Sigma ou proviennent de la collection du laboratoire. Chaque composé a été testé après un repos de 1 minute, deux fois sur l'antenne. Cinq antennes ont été testées et les réponses moyennes sont utilisées pour les résultats.

1.4. Formulations et tests des attractifs pour la pyrale

Quatre formulations différentes contenant de trois à six molécules candidates ont été testées en tunnel du vol et confrontées à un témoin représenté par une plante de maïs au stade 4 à 6 feuilles.

1.5. Comportement de la pyrale du maïs dans le tunnel

Les tests sont réalisés sur des insectes dont les larves ont été prélevées sur la plante et qui ont terminé leur développement sur du milieu semi artificiel. Les femelles fécondées pondent au début de la scotophase et tous les tests de laboratoire ont respecté ce rythme d'activité. Le tunnel du vol est parcouru par un flux d'air contrôlé et laminaire. Une très faible lumière rouge permet l'observation des comportements qui sont enregistrés avec une caméra infrarouge placée au-dessus du tunnel (Figure 3). Pour chaque individu testé, les paramètres de l'attraction : l'activation, le vol orienté dans le flux d'air odorisé, le vol autour de la source, sont notés.

2. RESULTATS

2.1. Les COV émis par le champ de maïs

Le bouquet odorant émis par le maïs est composé d'une dizaine de COV. C'est un mélange à base d'odeurs vertes, de monoterpènes et de sesquiterpènes dont les ratios changent entre le jour et la nuit (Figure 4). Les sesquiterpènes (a-copaène, b-caryophyllène, d-cadinène) sont majoritairement émis pendant le jour tandis que les monoterpènes (a-pinène, p-cymène, limonène, linalool) et certaines odeurs vertes comme cis-3-hexenyl acétate et cis-3-hexenol sont majoritairement émis pendant la nuit.

2.2. Test d'électroantennographie

Les femelles détectent mieux les COV de synthèse que les mâles. Les deux sexes détectent très bien certains monoterpènes (COV 4, COV 6, COV 9) et sesquiterpènes (COV 13). Il y a une différence de détection pour les COV 1, COV 5, pour lesquelles les femelles sont 2 fois plus sensibles que les mâles (Figure 5).

2.3. Comportement de la pyrale vis à vis l'odeur synthétique du maïs

Une série de tests non présentés ici a permis de sélectionner un mélange pertinent qui induit les mêmes comportements d'attraction que ceux suscités par le maïs (Figure 6).



Figure 1 – Prélèvement d'odeurs du maïs dans l'espace de tête du maïs avec les fibres SPME.



Figure 2 – Le poste d'électrophysiologie pour enregistrer étudier la détection des COV par les antennes de la Pyrale.

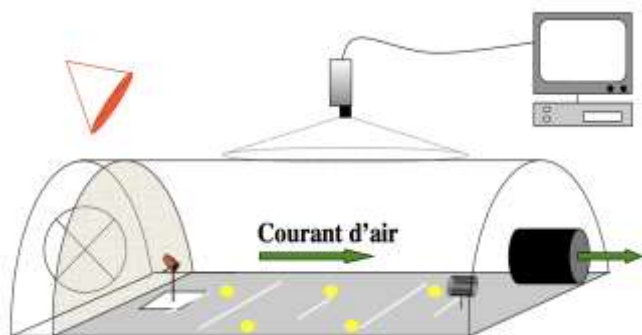


Figure 3 – Schéma du tunnel de vol utilisé pour étudier le comportement de Pyrales vis à vis des odeurs du maïs, naturelles ou de synthèse.

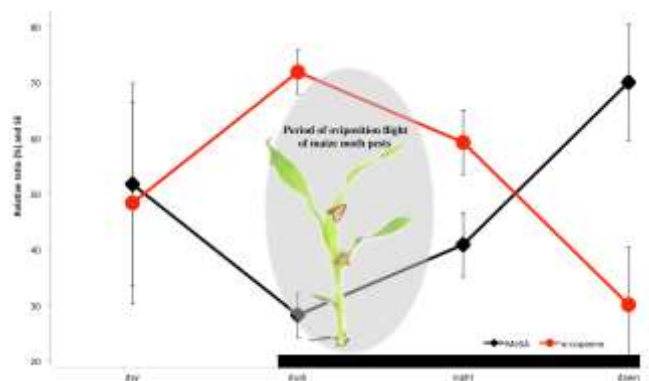


Figure 4 – Changement de ratio entre le méthyl salicylate (MeSA) et l'α-copaène dans le headspace du maïs prélevé de jour et de nuit (n=4). La période d'oviposition est en gris.

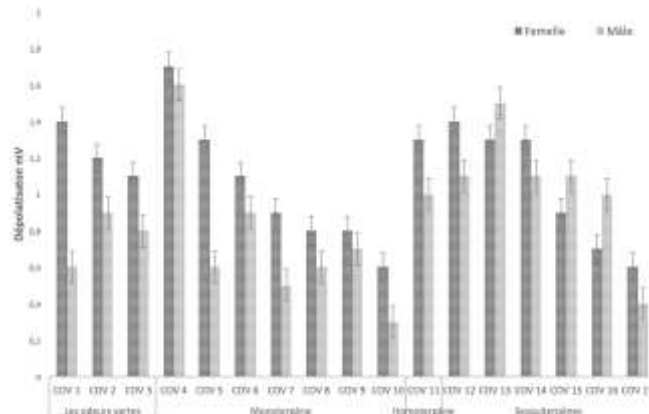


Figure 5 – Les réponses EAG des antennes stimulées par les COV identifiés par SPME-GC-MS.

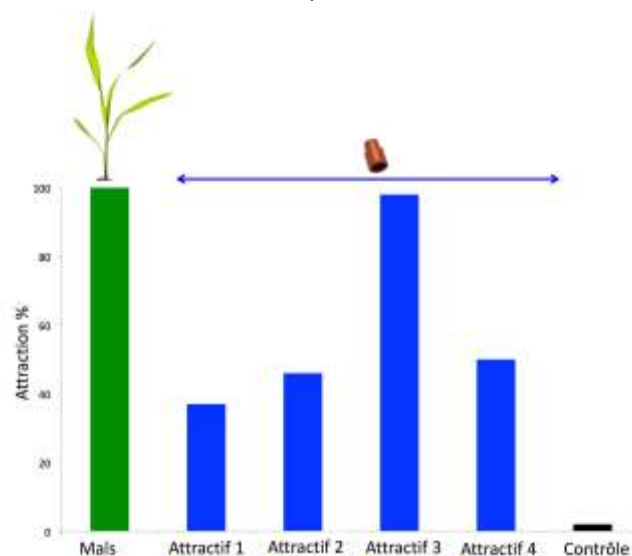


Figure 6 – Pourcentages d'attraction des femelles fécondées de Pyrales stimulées par le maïs et par des attractifs de synthèse.

DISCUSSION - CONCLUSION

La femelle de la pyrale, qui pond en début de nuit, utilise les COV émis par le maïs pendant cette période pour localiser la parcelle de maïs. Les résultats montrent clairement que les signaux chimiques produits par le maïs sont différents entre le jour et la nuit (Leppik et Frérot, 2014). L'ensemble du profil odorant est relativement pauvre en COV, mais la composition tant qualitative que quantitative est spécifique de la plante et de la période du jour ou de la nuit.

Le profil odorant du maïs au champ est différent du profil des plantes cultivées dans des pots dans les conditions du laboratoire (Solé *et al.* 2010). L'émission des COV par les plantes est dépendante des conditions biotiques : du métabolisme, du stade de développement, de la présence des bio agresseurs etc., et des facteurs abiotiques comme le climat, le cycle circadien, le sol, le déficit hydrique, la pollution, etc. (Holopainen *et al.* 2010; Jakobsen *et al.* 1994; Loreto *et al.* 2010). Ce point explique que nos résultats diffèrent de ceux décrits par Molnár *et al.* 2015. Bien que nous confirmions la présence dans l'espace de tête du maïs des deux constituants décrits comme attractifs : le nonanal et le décanal, ces produits évalués en tunnel de vol n'ont pas induit de comportement d'attraction. Sur le terrain (résultats non montrés) testés seuls ou en complément à notre attractif, les deux molécules n'ont pas modifié nos résultats.

La reconstitution avec les composés de synthèse d'une odeur naturelle, pertinente pour l'insecte, qui contient 4 composés sélectionnés sur la base de la réponse olfactive permet d'obtenir dans les conditions du laboratoire des comportements identiques à ceux obtenus avec la plante. Ces résultats confirment les observations antérieures qui démontraient que la localisation de la plante-hôte était assurée par une reconnaissance olfactive. La spécificité de l'attractif doit être étudiée. Les tests d'attractivité sur le terrain permettront de savoir si les autres ravageurs du maïs pourraient être attirés par ce mélange ou leurs comportements de ponte modifiés. L'attractif de synthèse quoique encore non applicable sur le terrain est un nouvel exemple de l'intérêt des kairomones pour la surveillance du ravageur et la lutte directe contre par les femelles fécondées.

Une meilleure connaissance des kairomones intervenant dans la relation plante cultivée – insecte ravageur pourrait dans l'avenir déboucher sur des moyens de lutte contre les ravageurs et constituer une alternative supplémentaire aux moyens de lutte insecticides. L'identification des kairomones est aussi un outil pour la sélection de variétés résistantes à la pyrale en fonction de la présence ou non de certains COV.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce aux soutiens financiers de la FNPSMS (Fédération Nationale de la Production des Semences de Maïs et de Sorgho) et d'Arvalis

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beyaert, I., Hilker, M., 2014. Plant odour plumes as mediators of plant–insect interactions. *Biological Reviews* 89: 68-81
- Dudareva, N., Picchulla, B., Pichersky, E., 2000. Biogenesis of floral scents. *Hort Rev* 24: 31-53
- Holopainen, J. K., Gershenzon, J., 2010. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci* 15: 176-184
- Jakobsen, H. B., Olsen, C. E., 1994. Influence of climatic factors on emission of flower volatiles in situ. *Planta* 192: 365-371
- Leppik, E., Frérot, B., 2012. Volatile organic compounds and host-plant specialization in European corn borer E and Z pheromone races. *Chemoecology* 22: 119-129
- Leppik, E., Frérot, B., 2014 a. Maize field odorscape during the oviposition flight of the European corn borer. *Chemoecology*: 1-8 doi:10.1007/s00049-014-0165-2
- Leppik, E., Frérot, B., 2014 b. A view of diel variation of maize odorscape. *American J. Plant Sci.*, 5 : 811-820
- Loreto, F., Schnitzler, J.-P., 2010. Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends Plant Sci* 15: 154-166
- Molnár, B. P., Tóth, Z., Fejes-Tóth, A., Dekker, T., Kárpáti, Z., 2015. Electrophysiologically-Active Maize Volatiles Attract Gravid Female European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*. *J Chem Ecol*: 1-9
- Renou, M., Lalanne-Cassou, B., Le Duchat D'aubigny, J., 1986. Etude electroantennographique de la sensibilité antennaire des mâles de 61 espèces de Noctuidae de Guadeloupe (Lepidoptera). *Ann soc entomol Fr.* 339-352
- Schoonhoven, L., Van Loon, J., Dicke, M., 2005. *Insect-plant biology*. Oxford University Press, Oxford; New York
- Showers, W. B., Reed, G. L., Robinson, J. F., Derozari, M. B., 1976. Flight and Sexual Activity of the European Corn Borer. *Environmental Entomology* 5: 1099-1104
- Solé, J.; Sans, A.; Riba, M.; Guerrero, A., Behavioural and electrophysiological responses of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* to host-plant volatiles and related chemicals. *Physiological Entomology* **2010**, 35, (4), 354-363.