Accès à la reproduction chez Silene dioica : une espèce dioïque entomophile

Estelle Barbot

▶ **To cite this version:**

Estelle Barbot. Accès à la reproduction chez Silene dioica : une espèce dioïque entomophile. Biologie végétale. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUR018 . tel-03470523

HAL Id: tel-03470523
https://theses.hal.science/tel-03470523

Submitted on 8 Dec 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

École Doctorale 104 : Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Thèse

pour obtenir le grade de docteur délivré par l'

Université de Lille

Discipline "Sciences Agronomiques et Écologiques"

présentée par

Estelle Barbot

le 12 avril 2021

sous la direction d'**Isabelle De Cauwer** et **Mathilde Dufaÿ**

Accès à la reproduction chez *Silene dioica*, une espèce dioïque entomophile

Jury

Patrice David - PR - CEFE - Montpellier,	Rapporteur
Joëlle Ronfort - DR - AGAP - Montpellier,	Rapportrice
Joël Cuguen - PR - EEP - Lille,	Président du jury
Sylvie Muratorio - DR - ECOBIOP - Saint-Pée-sur-Nivelle,	Examinatrice
Jacqui Shykoff - DR - ESE - Paris-Saclay,	Examinatrice
Isabelle De Cauwer - MCF - EEP - Lille,	Co-encadrante
Mathilde Dufaÿ - PR - CEFE - Montpellier,	Directrice de thèse

Laboratoire Évolution, Écologie et Paléontologie (EEP)
UMR CNRS 8198, F-59650 Cité scientifique, France

Table des matières

Liste des figures i

Liste des tableaux iii

Introduction **1**

I Sélections sexe-spécifiques **65**

Résumé en français du chapitre I **67**

Manuscript A: Natural and sexual selection in an insect-pollinated plant **69**

II Rôle des pollinisateurs dans la sélection **103**

Résumé en français du chapitre II **105**

Manuscript B: On the function of flower number: disentangling fertility from pollinator-mediated sexual and natural selection **107**

Manuscript C: Exploring the effects of scent emission and exposition to diurnal versus nocturnal pollinators on selection patterns on floral traits **139**

III Accès au pollen *in natura* **169**

Résumé en français du chapitre III **171**

Manuscript D: Determinants of pollen load variation in natural populations of a dioecious insect-pollinated species **173**

Discussion **203**

Liste des figures

Introduction

1 Exemples relatés par Darwin dans son livre *On the origin of species*. . . . 7
2 Schéma représentant les composantes de sélection par lesquelles les traits peuvent affecter le succès reproducteur. . . . 9
3 Résultats de l'expérience de Bateman. . . . 13
4 Exemple de situations de rencontre gamétique. . . . 23
5 Fleurs du Saule des chèvres, *Salix caprea*. . . . 26
6 Photo d'une fleur de *Morrenia odorata* et pollinaires. . . . 29
7 Résultats obtenus par Hoballah et al. (2007) chez *Petunia* sp. . . . 33
8 Représentation de deux morphes floraux. . . . 35
9 Noms utilisés pour désigner les structures florales. . . . 37
10 Exemples de dimorphisme sexuel chez des plantes dioïques zoogames. . . . 39
11 Schéma des différentes méthodes d'estimation du *mating success*. . . . 43
12 Schéma représentant la méthodologie pour estimer la sélection médiée par les pollinisateurs chez les femelles. . . . 48
13 Illustration du dimorphisme sexuel chez *Silene dioica*. . . . 50
14 Plan illustré de la thèse. . . . 51

Manuscript A: Natural and sexual selection in an insect-pollinated plant

1 Correlations between traits for OP females and OP males. . . . 82
2 Total natural selection on traits for each group of plants. . . . 83
3 Sex-specific natural and sexual selection on traits, and Bateman gradient. 87
SA1 Total natural selection on traits for each group of plants. . . . 97

Manuscript B: On the function of flower number: disentangling fertility from pollinator-mediated sexual and natural selection

1 Boxplots representing visits by pollinators according to treatment. . . . 120
2 Relation between (i) reproductive and (ii) mating success and flower number in each sex. . . . 122
3 Selection and mating gradients on the number of gametes per flower and PC1 in both sexes. . . . 124
SA1 Reflectance (%) according to wavelength for petals and crepe paper used to make dummy flowers. . . . 131
SA2 Fake flower versus real *Silene dioica* flowers. . . . 131
SA3 Pearson correlation indexes for PCA on petal reflectance. . . . 132

SA4 Dataset inertia explained by the ten first principal components. 133
SA5 Pollen dispersal kernel for control and manipulated males. 133
SB1 Re-analysis on mating success: relation between mating success and flower number in each sex. 136
SB2 Re-analysis on mating success : mating gradients on the number of gametes per flower and PC1 in both sexes. 136

Manuscript C: Exploring the effects of scent emission and exposition to diurnal versus nocturnal pollinators on selection patterns on floral traits

1 Absolute reproductive success per sex, per exclusion treatment and per PAA treatment 151
2 Selection gradients estimation on floral traits in each sex, and for exclusion treatment and PAA treatment. 153
3 Pollen dispersal kernel and distribution in mean pollen dispersal distance per male 155
S1 Picture of glass tube with PAA dilution. 163

Manuscript D: Determinants of pollen load variation in natural populations of a dioecious insect-pollinated species

1 Diagram of the mechanisms at different scales that can affect pollen load. 181
2 Mean flower number and mean corolla width in sampled populations. . . . 185
3 Mean pollen load per flower in sampled populations. 186
4 Effects on pollen load at the population level. 187
5 Interaction effects on pollen load at fine-scale. 188
SA1 Relationship between pollen load and seeds number. 196
SB1 Picture from the top of a stigma lobe. 198
SB2 Location of the 23 populations of *Silene dioica*. 199
SB3 Habitat characterization of two *Silene dioica* populations. 200

Liste des tableaux

Introduction

1 Résumé des études avec gradients de sélection sexe-spécifique sur les traits floraux. 36
2 Résumé des études décrivant le dimorphisme sexuel sur des traits attractifs. 38
3 Mesures utilisées dans la littérature pour quantifier la sélection sexuelle. . 46
4 Dimorphisme pour les traits floraux chez *Silene dioica*. 50

Manuscript A: Natural and sexual selection in an insect-pollinated plant

1 Trait mean ± SD in each of the three experimental groups. 83
2 Direct natural selection on traits. 85
3 Direct sexual selection on traits. 86
SA1 Properties of the five nuclear microsatellites used for individuals' genotypic characterization. 97
SA2 Correlations between traits for OP females and males. 98
SB1 Mean-standardized selection differentials on all traits measured. 100
SB2 Mean-standardized selection gradients on traits included in mixed models. 100
SB3 Mean-standardized mating gradients on traits included in mixed models. . 100

Manuscript B: On the function of flower number: disentangling fertility from pollinator-mediated sexual and natural selection

1 Effect of treatment on reproductive success and selection gradients on the different floral traits in both sexes. 119
2 Effect of treatment on mating success and mating gradients estimation on the different floral traits in both sexes. 122
SB1 Re-analysis on mating success. 135

Manuscript C: Exploring the effects of scent emission and exposition to diurnal versus nocturnal pollinators on selection patterns on floral traits

1 Number of individuals and mean flower number per group. 148
2 Seed-set, primary fruit-set (including predated fruits) and effective fruit-set (only non-predated fruits) for each experimental female group. 151
S1 Results from pairwise Levene's tests for homogeneity of variance in reproductive success between groups. 163
S2 Selection gradient estimates on each measured floral trait for males. . . . 164

S3 Selection gradient estimates on each measured floral trait for females. . . 164
S4 Comparison of selection strength between (i) PAA treatment and (ii) exclusion treatment for males. 165
S5 Comparison of selection strength between (i) PAA treatment and (ii) exclusion treatment for females. 165

Manuscript D: Determinants of pollen load variation in natural populations of a dioecious insect-pollinated species

1 DMS coordinates, sample year, population size, global sex-ratio and density for each sampled population. 182
2 Summary of the parameters. 183
3 Effect of individual floral traits and local demography characteristics on pollen load. 184
SB1 Grouping of the different types of land use in four habitats. 197

Discussion

1 Bilan des résultats majeurs de la thèse. 208

Introduction

Sommaire

1. Historique et corpus de la théorie de la sélection sexuelle : à travers le prisme animal 5
1.1 Le sexe comme mode de reproduction 5
1.2 La sélection sexuelle selon Darwin 6
1.3 Quels traits sous quelle(s) sélection(s) 8
1.3.1 Concilier la sélection naturelle et la sélection sexuelle 8
1.3.2 Distinguer la sélection sexuelle de la sélection de fécondité . 10
1.4 L'expérience de Bateman 12
1.5 Darwin, Bateman & le dimorphisme sexuel 15
1.6 Les différents mécanismes impliqués dans la sélection sexuelle . . 15
1.6.1 La sélection intrasexuelle 16
1.6.1.1 Pré-accouplement : trouver les partenaires 16
1.6.1.2 Post-accouplement : féconder les gamètes 17
1.6.1.3 Importance relative des processus pré- versus post-accouplement 18
1.6.2 La sélection intersexuelle 18
1.6.2.1 Les bénéfices directs : meilleur succès reproducteur de la femelle 19
1.6.2.2 Les bénéfices indirects : meilleur succès reproducteur des descendants 19
1.7 Contextualiser la sélection sexuelle 21
1.7.1 Caractéristiques de la population 21
1.7.2 Caractéristiques spatio-temporelles 21
2. La sélection sexuelle généralisée au-delà des modèles classiques d'études 21
2.1 Les cas particuliers chez les animaux 22
2.1.1 Animaux hermaphrodites : les sexes au sein d'un même individu 22
2.1.2 Animaux à fécondation externe : les gamètes au centre de la sélection sexuelle 22
2.2 Extension de la théorie de la sélection sexuelle aux plantes 24
2.2.1 Réticences a priori sur l'application de la sélection sexuelle aux plantes 24
2.2.2 Equivalence des mécanismes de la sélection sexuelle chez les plantes 27
2.2.2.1 Sélection intrasexuelle 27
2.2.2.2 Sélection intersexuelle : choix cryptique des femelles 30
2.2.3 Des traits floraux et des pollinisateurs 32

2.2.3.1 Mécanismes impliqués dans l'interaction traits floraux-pollinisateurs 32
2.2.3.2 Sélection sexe-spécifique sur les traits floraux . . 34
2.2.3.3 Dimorphisme sur les traits floraux chez les espèces dioïques 37
2.2.3.4 Contexte écologique et limitation pollinique . . . 39
3. Etudier la sélection sexuelle 40
3.1 Mesurer la sélection naturelle 41
3.2 Gradients de sélection sexuelle 42
3.3 Comment définir le *mating success* 42
3.4 Les métriques utilisées 45
3.5 Mesurer expérimentalement la sélection sexuelle 47
4. Les objectifs de cette thèse 49
4.1 Le modèle d'étude 49
4.2 Les questions posées 51

« Les nuances, c'est des coups à plus s'y retrouver. »
L'Accordéon - Brèves de Comptoir (J-M. Gourio)

Cette introduction générale est structurée en quatre parties. Dans la première partie, la théorie de la sélection sexuelle sera abordée d'un point de vue historique, donc chez les animaux, et les différentes formes de sélection seront définies. Dans la seconde partie, la théorie de la sélection sexuelle sera élargie à un plus large spectre d'organismes, en faisant un focus particulier sur les plantes à fleurs. Dans la troisième partie, la méthodologie pour étudier la sélection sexuelle sera discutée, notamment chez les plantes zoogames. Enfin, dans la dernière partie, l'organisme d'étude, *Silene dioica*, sera présenté et les questions posées dans le cadre de cette thèse seront énoncées.

1. Historique et corpus de la théorie de la sélection sexuelle : à travers le prisme animal

1.1 Le sexe comme mode de reproduction

Tout processus évolutif, qu'il soit biologique, culturel ou encore algorithmique, nécessite des itérations. En biologie, ces itérations passent par la reproduction des organismes à chaque génération. On distingue ainsi deux types de reproduction, asexuée et sexuée, certains organismes étant capables des deux. Néanmoins, la quasi-ubiquité de la reproduction sexuée chez les eucaryotes amène à penser que ce mode de reproduction est avantageux (Muller, 1932; Speijer et al., 2015). L'argument principalement évoqué, et qui fut introduit par August Weismann, est que le sexe permet dans la majorité des cas d'augmenter la variabilité des descendants (Weismann, 1893; Burt, 2000). Or, la présence de variabilité est une condition nécessaire, bien que non suffisante, pour que le mécanisme de sélection puisse opérer à chaque génération.

Néanmoins, la reproduction sexuée est également coûteuse. Elle nécessite entre autres (i) la production de gamètes par le biais de la méiose, (ii) qui ne contiennent que la moitié du matériel génétique, (iii) qui doivent rencontrer d'autres gamètes, (iv) ce qui peut donner place à des conflits génétiques (Otto et Lenormand, 2002; Lehtonen et al., 2012). Dans cette liste de potentiels coûts successifs, la rencontre entre gamètes ne sera efficace et ne donnera lieu à un zygote que si ceux-ci sont compatibles. Ainsi, la compatibilité entre gamètes dépend de leur identité, deux gamètes de même type ne pouvant fusionner. On distingue alors deux familles de gamètes : (i) les gamètes isogames, de morphologie identique mais de types différents, et (ii) les gamètes anisogames, où le type est également associé à un dimorphisme de taille (Jennions et Kokko, 2010).

Chez les eucaryotes, ce processus de rencontre entre gamètes compatibles nécessite l'existence d'organes spécialisés qui produisent ces différents gamètes ; organes qui sont donc de sexes

différents. Ces organes peuvent être présents au sein d'un même individu, on parle alors d'hermaphrodisme, ou chez des individus séparés, on parle alors de gonochorisme. Il peut également exister un continuum entre ces deux stratégies au sein des espèces. Qu'importe néanmoins la structuration des sexes au sein d'une espèce, la génération d'un zygote nécessite l'acquisition de partenaires sexuels qui vont pouvoir fournir ces gamètes de types opposés (Encadré 1). Ce partenaire sexuel peut-être soi-même dans les cas des individus hermaphrodites auto-compatibles, ou un autre individu. C'est sur ce postulat que se base initialement la théorie de la sélection sexuelle.

Encadré 1: L'origine du sexe et le nombre de sexes

Le sexe désigne à la fois le mode de reproduction mais également les différents types (p. ex. de gamètes, d'organes, d'individus) impliqués dans cette reproduction. Le sexe en tant que mode de reproduction est probablement apparu dans un premier temps chez une espèce aquatique où les proto-gamètes produits diffusaient et fusionnaient au gré des turbulences liées au milieu. Ces proto-gamètes étaient probablement de deux types, c'est-à-dire de deux sexes, et isogames (Jennions et Kokko, 2010; Parker, 2020). Les modèles théoriques stipulent que l'anisogamie a évolué ensuite, par spécialisation des gamètes dans des types de tailles différentes (Parker et al., 1972). Les clades qui présentent un continuum dans les systèmes isogames-anisogames, constituent ainsi des modèles de choix pour étudier la transition vers l'anisogamie (Togashi et al., 2012).

Dans cette thèse, nous nous intéresserons uniquement au cas le plus répandu des espèces à deux sexes, femelle et mâle. Il est cependant à noter qu'il existe chez certains organismes une diversité plus importante de sexes (p. ex. les champignons ; Whitfield, 2004). Néanmoins, les morphes ou le nombre de types sexuels n'importent pas pour l'idée fondamentale associée à la sélection sexuelle (Andersson, 1994; Beekman et al., 2016). Le sexe, en tant que mode de reproduction, implique une rencontre entre les différents sexes, qu'ils soient isogamiques ou anisogamiques. C'est sur les traits qui vont augmenter cette probabilité de rencontre que la sélection sexuelle va agir.

1.2 La sélection sexuelle selon Darwin

De nombreuses espèces sexuées présentent un dimorphisme sexuel, c'est-à-dire des traits différents selon le sexe (Figure 1; Mori et al., 2017). C'est sur base de cette observation, documentée dans son livre *On the origin of species*, que Darwin s'interrogea sur les raisons d'un tel dimorphisme (Darwin, 1859)

> *« Thus it is, as I believe, that when the males and females of any animal have the same general habits of life, but differ in structure, colour, or ornament, such differences have been mainly caused by sexual selection; that is, individual males have had, in successive generations, some slight advantage over other males, in their weapons, means of defence, or charms; and have transmitted these advantages to their male offspring. »*

Darwin fut ainsi le premier à s'interroger sur la sélection sexuelle en tant que mécanisme à la base du dimorphisme sexuel. Sa description verbale fut par la suite étayée dans un autre

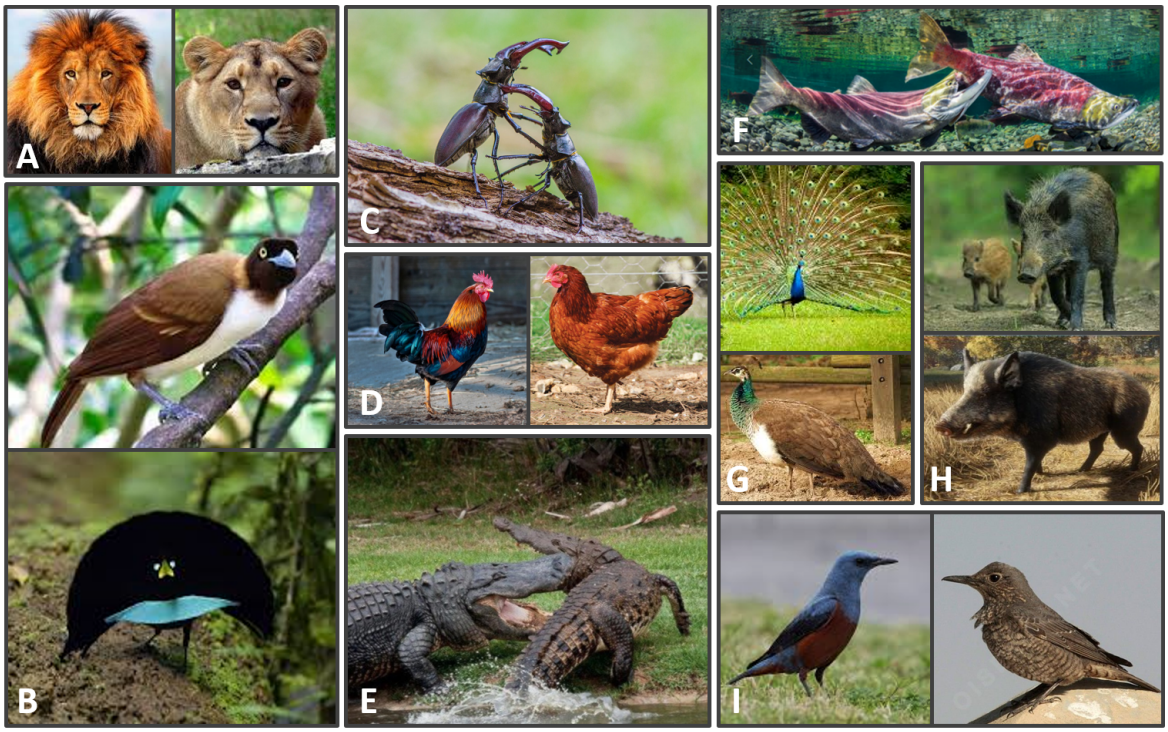


Figure 1: Exemples relatés par Darwin dans son livre *On the origin of species*, qui ont permis de documenter l'éventuelle existence du mécanisme de sélection sexuelle par observation du dimorphisme sexuel sur des caractères sexuels secondaires. (A) *Panthera leo* : présence d'une crinière chez le mâle (gauche), absente chez la femelle (droite). (B) Paradisaeidae: le plumage extravagant du mâle (bas) associé à sa danse nuptiale, absent chez la femelle (haut). (C) Lucanidae : combat entre mâles avec leurs mandibules hypertrophiées. (D) Galliformes : plumes colorées, queue plus grande et crête du mâle (gauche), absents chez la femelle (droite). (E) Crocodilia : combat entre mâles. (F) Salmonidae : combat entre mâles à l'aide de leur mâchoire crochue. (G) *Pavo cristatus* : grandes plumes colorées de la queue du paon mâle (haut), absente chez la femelle (bas). (H) *Sus scrofa* : crinière du mâle (bas) absente chez la femelle (haut). (I) *Monticola solitarius* : le mâle (gauche) porte des plumes de couleurs vives contrairement à la femelle (droite). Photos issues de Google Image.

de ses illustres livres *The descent of man, and selection in relation to sex* (Darwin, 1871). Il faisait alors une différence entre caractères sexuels primaires et secondaires :

> *« With animals which have their sexes separated, the males necessarily differ from the females in their organs of reproduction; and these afford the primary sexual characters. But the sexes often differ in what Hunter*[1] *has called secondary sexual characters, which are not directly connected with the act of reproduction; for instance, in the male possessing certain organs of sense or locomotion, of which the female is quite destitute, or in having them more highly-developed, in order that he may readily find or reach her; or again, in the male having special organs of prehension so as to hold her securely. »*

Ainsi selon Darwin, la sélection sexuelle s'appliquait uniquement aux caractères sexuels secondaires, et il faisait donc une entière distinction entre sélection sexuelle et sélection naturelle (Jennions et Kokko, 2010). D'une part, la sélection naturelle agit selon lui sur les traits liés à la survie et/ou la fécondité, la fécondité pouvant être définie comme un investissement primaire dans la reproduction, donc dans la production de gamètes (p. ex. fréquence de production, nombre, qualité; voir section 1.3). D'autre part, la sélection sexuelle ne s'appliquerait qu'aux traits qui jouent un rôle dans l'acquisition de partenaires sexuels avec lequel un individu partage sa descendance (Arnold, 1983). Il ne niait cependant pas que les deux processus étaient dans certains cas profondément intriqués : *« But in most cases it is scarcely possible to distinguish between the effects of natural and sexual selection. »* (Darwin, 1871). Cette vision Darwinienne de la sélection sexuelle, avec la dichotomie entre sélection naturelle versus sexuelle, pose néanmoins des problèmes sémantiques. En effet, il est parfois difficile de discriminer de manière expérimentale sur quels aspects de la valeur sélective un trait va pouvoir agir. Dans la section suivante, les différents modes de sélection et les types de traits sur lesquels la sélection sexuelle peut agir seront définis.

1.3 Quels traits sous quelle(s) sélection(s)

1.3.1 Concilier la sélection naturelle et la sélection sexuelle

Comme développé précédemment, Darwin définissait la sélection naturelle comme le type de sélection agissant sur les traits liés à la survie ou la fécondité ; il s'agit du fameux précepte du « *struggle for life* ». Néanmoins, une définition plus moderne de la sélection naturelle passe par le concept de valeur sélective (*fitness*), introduit par la théorie synthétique de l'évolution (Orr, 2009). La valeur sélective est ainsi définie de manière théorique comme la contribution aux générations suivantes d'une classe, génotypique ou phénotypique. Les individus ayant un génotype/phénotype qui leur confère une forte valeur sélective augmentent alors en fréquence par le biais de la sélection naturelle. Expérimentalement, cette valeur sélective est difficilement mesurable, puisqu'elle est également soumise à des processus stochastiques, difficilement contrôlables. Elle nécessite des mesures sur différents individus de la même classe génotypique ou phénotypique, afin d'estimer son espérance. La valeur sélective est ainsi souvent

[1] John Hunter (1728-1793) était chirurgien et naturaliste ; ses travaux ne furent publiés qu'à titre posthume dans *Essays and observations*, édité par Owen, Vol I. 1861.

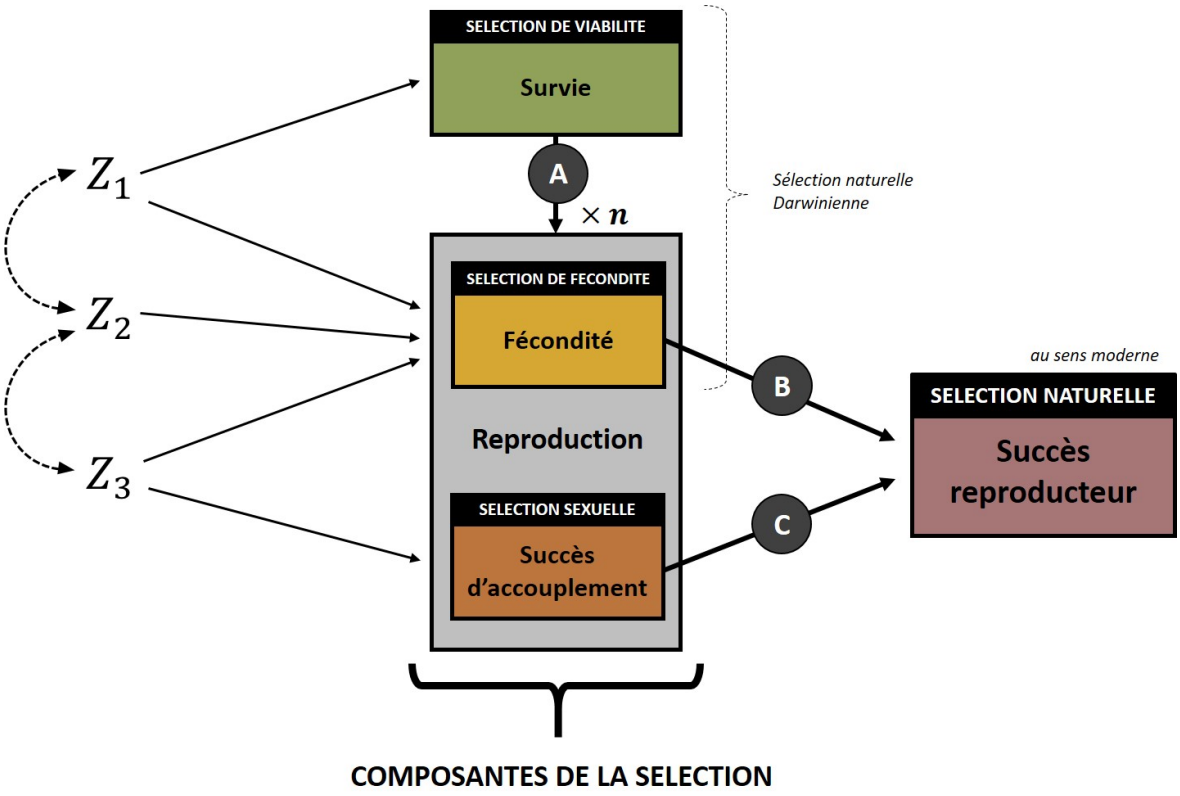


Figure 2: Schéma représentant les composantes de sélection par lesquelles les traits peuvent affecter le succès reproducteur. Les traits sont représentés par Z_i et peuvent influencer la survie et/ou la fécondité et/ou le succès d'appariement. Une covariance génétique peut exister entre ces traits, représentée en trait noir pointillé. (A) La survie, définie comme la durée de vie, impacte le nombre d'évènements de reproduction n. (B) La fécondité, définie comme le nombre et la qualité des gamètes, affecte le nombre maximal absolu de descendants (c-à-d en conditions non limitantes de gamètes du sexe opposé et sans compétition dans un environnement donné). Elle comprend également des processus post-zygotiques, comme les soins parentaux. (C) Le succès d'accouplement augmente l'accès aux partenaires sexuels et/ou aux gamètes du sexe opposé (c-à-d le nombre maximal de descendants en considérant les interactions avec les conspécifiques) que les gamètes produits, fonction de la fécondité, peuvent féconder.

estimée par le biais du succès reproducteur (*reproductive success*), défini à l'échelle individuelle. Il s'agit alors en quelque sorte d'une valeur sélective réalisée, en prenant en compte les processus stochastiques. On mesure le succès reproducteur d'un individu comme le nombre de descendants laissés à la génération suivante ; il s'agit alors du succès reproducteur à vie (*lifespan reproductive success*).

A partir de là, si l'action de la sélection naturelle résulte en une augmentation en fréquence des individus ayant une plus forte valeur sélective réalisée, mesurée par le biais du succès reproducteur (à vie), on s'éloigne de la vision dichotomique darwinienne entre (i) sélection naturelle agissant sur des traits liés à la survie et la fécondité et (ii) sélection sexuelle agissant sur des traits liés à l'accès aux partenaires sexuels. Alors que la sélection sexuelle devient une des composantes de sélection (avec celle de viabilité et celle de fécondité), la sélection naturelle au sens moderne est maintenant définie comme la résultante de l'ensemble de ces composantes de sélection (Figure 2 ; Encadré 2).

Encadré 2: Evolution d'un trait sous sélection sexuelle

Finalement, les définitions selon Darwin de (i) la sélection naturelle et (ii) la sélection sexuelle incluaient toutes les deux le nombre de descendants. Il parlait en fait respectivement (i) de sélection naturelle au sens moderne via les composantes de sélection de viabilité et de fertilité versus (ii) de sélection naturelle au sens moderne via la composante de sélection sexuelle (Figure 2). Ainsi, en se focalisant sur les caractères sexuels secondaires pour sa définition de la sélection sexuelle, Darwin parlait bien des traits qui avaient pu évoluer par l'action de la sélection naturelle au sens moderne. Ces traits remplissaient les trois conditions sinequanone pour qu'il y ait évolution d'un trait par la sélection sexuelle (valable aussi pour les autres composantes de sélection), définies plus tard avec l'émergence de la génétique quantitative, c'est-à-dire :

(i) Variation phénotypique pour ce trait

(ii) Association entre le trait et le succès reproducteur par le biais du succès d'accouplement (ou de la survie ou fécondité pour les autres composantes de sélection)

(iii) Héritabilité pour ce trait

A l'aide de cette définition contemporaine de la sélection naturelle, il devient plus simple de définir les différentes voies par lesquelles un trait peut affecter le succès reproducteur (Figure 2) :

(i) par le biais de la survie, dans le cas de traits qui affectent la probabilité d'avoir un épisode de reproduction complet ou plusieurs épisodes de reproduction ; on parle alors de sélection de viabilité.

(ii) par le biais de la fécondité, dans le cas de traits qui impactent l'investissement dans le nombre et/ou la qualité de ses gamètes ; on parle alors de sélection de fécondité.

(iii) par le biais du succès d'accouplement, dans le cas des traits qui affectent le nombre de partenaires avec lequel un individu va se reproduire et/ou son accès aux gamètes du sexe opposé. Les traits qui confèrent un plus grand succès d'accouplement vont être sous sélection sexuelle.

1.3.2 Distinguer la sélection sexuelle de la sélection de fécondité

Il est à noter que la sélection sexuelle ne passe pas uniquement par des processus pré-accouplement (comme le suggérait Darwin ; Eberhard, 2009), mais également et peut-être même de manière plus importante par des processus post-accouplement (voir section 1.6 ; Pischedda et Rice, 2012). Néanmoins, en incluant ces processus post-accouplement dans la sélection sexuelle, il devient difficile de distinguer la sélection de fécondité et de la sélection sexuelle (Alonzo et Servedio, 2019). En effet, ces deux processus jouent de manière conjointe au sein d'un épisode de reproduction, et se passent tous les deux principalement à l'échelle gamétique[2]. Néanmoins, tandis que la sélection via la fécondité peut se comprendre dans

[2]La fécondité comprend également les notions de soins parentaux, par exemple.

le cadre d'un accès illimité aux partenaires/gamètes du sexe opposé, la sélection sexuelle se comprend exclusivement dans le cadre d'un accès contraint au(x) sexe(s) opposé(s). Le nombre de rencontres entre gamètes (c-à-d le nombre de potentiels futurs descendants) étant alors limité, un individu se reproduisant constitue une perte pour la descendance de tout autre individu du même sexe.

Ces définitions de la sélection sexuelle et de la sélection de fécondité n'enlèvent cependant en rien la complexité à dissocier expérimentalement les avantages d'un trait en termes de sélection sexuelle ou de sélection de fécondité. Les notions de composantes de la sélection apportent un cadre théorique solide pour mieux comprendre l'évolution des traits, mais il reste de nombreuses « zones grises » où il est difficile, parfois impossible, de distinguer les deux composantes (Alonzo et Servedio, 2019). Préciser explicitement par le biais de quel estimateur (p. ex. le nombre de partenaires sexuels) un trait est sous sélection sexuelle devrait permettre dans les futures recherches de lever certains doutes sur ces zones grises (voir section 3.3).

La similitude apparente entre sélection de fécondité et sélection sexuelle se transcrit également au niveau des traits sur lesquelles ces formes de sélection agissent. Comme nous l'avons vu, Darwin définissait les caractères sexuels secondaires comme ceux qui étaient avantageux sous le prisme de la sélection sexuelle, et qui sont parfois contre-intuitifs sous sa définition de la sélection naturelle. Il faisait ainsi une nette distinction avec les caractères sexuels primaires, tels que ceux directement impliqués dans la production de gamètes ou les organes permettant les soins parentaux (sélection de fécondité ; Figure 2 ; Arnold, 1983). Cependant, cette dichotomie entre caractères sexuels primaires et secondaires n'est pas si évidente. En effet, les organes génitaux sont parfois le produit à la fois de la sélection de fécondité et de la sélection sexuelle (Eberhard, 1985). Une analyse comparative a ainsi montré que les organes génitaux mâles de plusieurs familles d'insectes montraient un taux de divergence deux fois plus important au sein des groupes polygames par rapport aux groupes monogames (Arnqvist, 1998). Il est alors plus correct de nuancer, en considérant d'une part les caractères sexuels primaires comme majoritairement façonnés via la sélection de fécondité, d'autre part les caractères sexuels secondaires comme majoritairement façonnés via la sélection sexuelle. Une expérience s'est ainsi attachée à comprendre comment la suppression du mécanisme de sélection sexuelle pouvait influencer l'évolution des caractères sexuels secondaire (Holland et Rice, 1999). Les auteurs ont fait évoluer expérimentalement une population de *Drosophila melanogaster* sur 47 générations, en agissant simultanément sur les deux conditions suivantes : (i) les individus étaient en conditions monogames et (ii) le mâle était assigné aléatoirement à la femelle. Ainsi, (i) la compétition intrasexuelle était supprimée, tous les individus se reproduisant, et (ii) le choix femelle était également supprimé. A la fin de l'expérience d'évolution expérimentale, les caractères sexuels secondaires étaient ainsi minimisés. Les mâles avaient diminué la durée des parades sexuelles (p. ex. vibration des ailes), et la toxicité de leur liquide séminal, impliqué dans la compétition spermatique (voir section 1.6), avait également

diminué.

1.4 L'expérience de Bateman

Il faudra attendre 80 ans pour que les prédictions verbales de Darwin soient confrontées à l'expérimentation. Les travaux de Bateman apportent alors une possible explication factuelle au dimorphisme sexuel souvent observé chez les animaux, avec les mâles présentant des traits plus extravagants (Bateman, 1948). Bateman travaillait sur une population de drosophiles hétérozygotes pour des mutations phénotypiques dominantes, ce qui lui permettait de déduire les relations de parenté et donc le succès d'accouplement (dans cette étude, le nombre de partenaires sexuels). Bateman s'intéressait ainsi à l'effet du succès d'accouplement sur le succès reproducteur. Cette relation sera plus tard renommée le gradient de Bateman (Figure 3). Trois résultats principaux se dégagent de l'expérience. Le premier est que les mâles possèdent une plus grande variance du succès reproducteur. Le second est qu'ils possèdent également une plus grande variance dans le nombre de partenaires sexuels. Ces deux premiers résultats étaient interprétés comme le signe d'une compétition intrasexuelle plus marquée que chez les femelles. Enfin, le troisième résultat est la mise en évidence d'une corrélation positive linéaire entre l'accès aux partenaires sexuels et le succès reproducteur des mâles, relation qu'on ne retrouve pas chez les femelles. Chez ces dernières, le succès reproducteur n'augmente pas linéairement avec l'accès aux partenaires sexuels mais atteint un seuil au-delà duquel l'acquisition de nouveaux partenaires n'a plus de bénéfice en termes de succès reproducteur. Bateman déduisit de cette troisième observation que les femelles seraient principalement limitées par les ressources pour leur succès reproducteur, tandis que les mâles seraient limités par le nombre de partenaires sexuels. L'auteur avait émis l'hypothèse que l'origine de ces facteurs limitants différents entre sexes était l'anisogamie. La théorie selon Bateman prédit alors que le sexe investissant le plus de ressources dans la production de gamètes est celui qui est le moins soumis à la sélection sexuelle via la compétition intrasexuelle (Bateman, 1948).

Plus tard, Trivers (1972) élargit cette prédiction en termes d'investissement parental. Il ne s'agit alors plus uniquement de ressources énergétiques, mais de tous les efforts de la part d'un individu qui permettent d'augmenter le nombre et la survie de ces descendants. Ainsi, lorsque c'est le mâle qui investit le plus, le gradient de Bateman pour les mâles devrait montrer une pente moins forte que pour les femelles, comme l'ont montré des études sur le siphonostome *Syngnathus* sp. chez qui le mâle porte les descendants (Mobley et Jones, 2012; Jones et al., 2000). Néanmoins, ces systèmes particuliers sont des exceptions : le sexe femelle est très généralement celui qui investit le plus dans la descendance et une méta-analyse récente confirme que dans la majorité des cas le gradient de Bateman est plus fort chez les mâles que chez les femelles (Janicke et al., 2016).

Enfin, ces résultats ont permis de dégager ce qui est maintenant connu sous le nom des principes de Bateman, souvent étudiés à l'aide de trois métriques classiques (Arnold, 1994a; Jones et al., 2002). Ces principes stipulent que le sexe dont les traits seront le plus soumis à

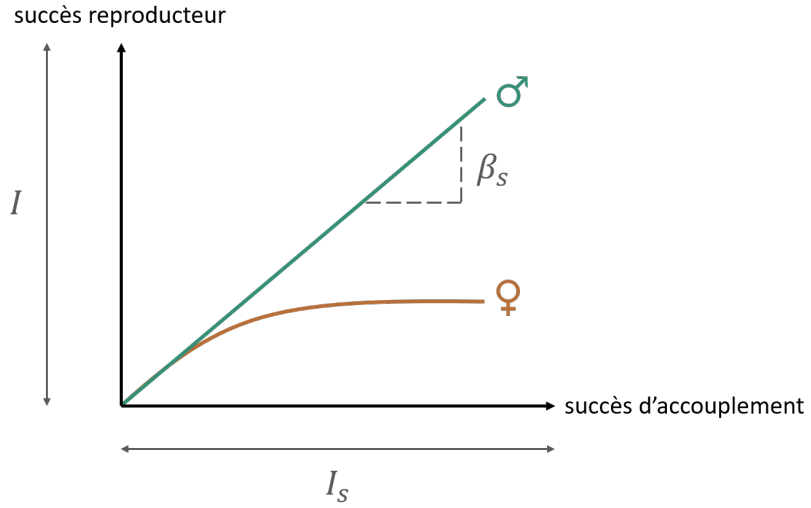


Figure 3: Résultats de l'expérience de Bateman. Gradient de Bateman ; régression du succès reproducteur sur le succès d'accouplement pour chacun des deux sexes. L'opportunité pour la sélection I, l'opportunité pour la sélection sexuelle I_S et la pente du gradient de Bateman β_S sont indiqués.

la sélection sexuelle :

(i) a la plus forte variance de succès reproducteur, appelée opportunité pour la sélection I (Wade, 1979; Figure 3).

(ii) a la plus forte variance de succès d'accouplement, appelée opportunité pour la sélection sexuelle I_S (Wade, 1979; Wade et Arnold, 1980; Figure 3).

(iii) a la plus forte pente du gradient de Bateman β_S, c'est-à-dire la régression du succès reproducteur sur le succès d'accouplement (Arnold et Duvall, 1994; Figure 3).

D'autres métriques ont également été développées plus tard afin de quantifier la sélection sexuelle (voir section 3.4). Bien que leurs interprétations comportent certaines limites, les métriques de Bateman restent les plus populaires dans les études sur la sélection sexuelle (Jones, 2009; Henshaw et al., 2016). Il est également à noter que les travaux de Bateman ont été récemment critiqués d'un point de vue méthodologique, appelant à être précautionneux quant à leurs interprétations (Encadré 3).

Encadré 3: Principes de Bateman : une avancée théorique majeure basée sur un travail expérimental imparfait

Bien des années plus tard, plusieurs auteurs ont remis en question les résultats issus des travaux de Bateman. Ainsi, Snyder et Gowaty (2007) pointent du doigt plusieurs faiblesses méthodologiques, ainsi que des biais d'échantillonnage et statistiques, bien que les auteurs concèdent que celui-ci était limité par les outils disponibles à son époque. Le plus fort biais avancé par les auteurs concerne la création de lignées homozygotes pour les dix mutations qui permettent de phénotyper les individus. A partir de ces lignées, Bateman créait des parents hétérozygotes, ce qui lui permettait de retracer les relations de paternité, et donc d'estimer à la fois le succès reproducteur mâle et les succès d'accouplement mâle et femelle.

Néanmoins, en créant des lignées homozygotes, Bateman a diminué la variance génétique chez les individus, hors locus utilisés pour le phénotypage. Les pères étaient ainsi génétiquement très identiques entre eux, ce qui pouvait compromettre l'action de la sélection sexuelle. Par ailleurs, l'une des mutations employées a un effet négatif en termes d'accouplement sur les femelles, qui ont plus de difficultés à écarter les ailes pour laisser approcher les mâles. Il ne faut toutefois pas oublier que les outils moléculaires permettant les analyses de paternité n'existaient pas encore à l'époque, et que Bateman était conscient des biais qu'implique l'utilisation de mutations. Egalement, les biais d'échantillonnage (illustrés par un succès reproducteur moyen différent entre les deux sexes alors que le sexe-ratio était équilibré, et la prise en compte de certaines lignées uniquement pour les analyses statistiques) amènent à considérer ces résultats expérimentaux avec précaution (Tang-Martinez, 2005).

Un autre problème pointé du doigt concerne l'analyse de ces données, réalisée sans les outils statistiques dorénavant disponibles. Snyder et Gowaty (2007) ont ainsi ré-analysé les données mises partiellement à disposition par Bateman, et ne retrouvent pas la relation saturante observée chez les femelles dans la publication originelle. Le gradient de Bateman serait donc linéaire et positif dans les deux sexes. Une autre équipe a ré-analysé les données de Bateman en se procurant cette fois-ci ses notes de laboratoires, et retrouve à nouveau cette pente positive chez les femelles (Hoquet et al., 2020). Enfin, il a également été avancé que les résultats obtenus par Bateman à partir de ces données auraient pu être obtenus par chance (Sutherland, 1985).

L'ensemble de ces biais d'échantillonnage et statistiques ont finalement amené des chercheurs à réitérer exactement l'expérience de Bateman (Gowaty et al., 2012, 2013). Les résultats montrent que les descendants exprimant deux mutations souffrent d'une plus forte mortalité, ce qui conduit à biaiser l'estimation du nombre de descendants et de partenaires reproducteurs. Ceci amène donc également à une mauvaise estimation des variances du succès reproducteur et du succès d'accouplement, qui sont à la base des principes de Bateman. Pour ces diverses raisons, certains auteurs appellent à ne plus considérer les principes de Bateman comme un paradigme, mais plutôt comme des hypothèses de travail (Tang-Martinez, 2012; Tang-Martínez, 2016; Hoquet, 2020).

1.5 Darwin, Bateman & le dimorphisme sexuel

Ainsi que l'avait relevé Darwin, le dimorphisme sexuel observé sur les caractères sexuels secondaires chez les animaux va souvent dans le sens où les mâles présentent des phénotypes plus extrêmes (Darwin, 1871; Janicke et al., 2016; Mori et al., 2017). Parfois même, le dimorphisme est tellement exagéré que les sexes d'une même espèce ont initialement été décrits comme des espèces différentes (Jennions et Kokko, 2010). D'après Bateman, l'anisogamie pourrait être parfois responsable de ses pressions de sélection sexuelle différentes entre les sexes, et donc à l'origine du dimorphisme observé (Bateman, 1948). Pour la plupart des exemples de traits dimorphiques relevés par Darwin, il est ainsi simple d'imaginer la relation entre le trait phénotypique et l'accès aux partenaires sexuels (Figure 1). Toutefois, il est à noter que l'évolution d'un dimorphisme peut aussi découler de l'action des autres composantes de la sélection. Par exemple, les sexes peuvent différer dans leur besoin en ressources, sans que ce processus soit mutuellement exclusif avec la sélection sexuelle (Shine, 1989). Il peut également y avoir une compétition intra-spécifique pour les ressources, qui peut dans certaines conditions conduire à une différenciation de niche écologique[3] et donc à un dimorphisme sexuel pour les traits impliqués dans l'acquisition de ressources (De Lisle et Rowe, 2015). Par ailleurs, l'absence de dimorphisme sexuel ne veut pas dire absence de la sélection sexuelle, celle-ci agit bien sur les traits liés à l'accès aux partenaires/gamètes de sexe opposé. La sélection sexuelle est donc basée sur des patrons de sélection, et non sur la résultante de ces patrons, qui pourrait inclure un potentiel dimorphisme (Levitan, 2010). Par exemple, si la sélection agit dans la même direction et avec la même intensité chez les deux sexes, ou s'il n'y a pas d'héritabilité pour les traits sous sélection, alors aucun dimorphisme ne peut évoluer. C'est d'ailleurs en remettant en cause le dimorphisme sexuel comme preuve directe de l'action de la sélection sexuelle que Bateman mis au point son expérimentation, qui visait à mesurer explicitement la sélection sexuelle (Bateman, 1948).

1.6 Les différents mécanismes impliqués dans la sélection sexuelle

Lorsque Darwin décrivit verbalement sa théorie de la sélection sexuelle, il distinguait deux types de sélection déjà rapidement évoquées : (i) la sélection qui résulte de toute forme de compétition entre individus du même sexe, appelée sélection intrasexuelle et (ii) la sélection qui résulte du choix du partenaire du sexe opposé, appelée sélection intersexuelle (Darwin, 1871). Il est souvent fait référence aux mâles lorsque l'on parle de sélection intrasexuelle, et aux femelles lorsque l'on parle de sélection intersexuelle. Ce raccourci prévaut dans la plupart des cas, car il s'avère qu'effectivement les mâles sont généralement plus soumis que les femelles à la compétition pour l'accès aux partenaires sexuels (Janicke et al., 2016). Dans cette section, par souci de simplicité, ne seront discutés que des exemples mâles pour la sélection intrasexuelle et des exemples femelles pour la sélection intersexuelle.

[3] Le milieu occupé par un ensemble d'individus, selon les conditions biotiques et abiotiques nécessaires à leur survie et reproduction.

1.6.1 La sélection intrasexuelle

Chez les animaux à fécondation interne, il est possible de discriminer la compétition liée à la sélection intrasexuelle en deux catégories selon la temporalité, pré ou post-accouplement. Ainsi, la compétition pré-accouplement a lieu entre individus et affectera le succès d'accouplement, dans le sens de la compétition pour l'accès aux partenaires sexuels. La compétition post-fertilisation, quant à elle, a lieu entre gamètes une fois l'accouplement achevé et impactera le succès de fécondation, dans le sens de la compétition pour l'accès aux gamètes du sexe opposé.

1.6.1.1 Pré-accouplement : trouver les partenaires

Le mécanisme le plus marquant de compétition pré-accouplement est celui des combats entre mâles. Déjà Darwin évoquait les mandibules hypertrophiées des lucanes ou encore les mâchoires des saumons comme exemples de traits ayant évolué du fait de leur implication dans la probabilité de gagner ces combats (Figure 1 ; Darwin, 1871). On parle alors de compétition par interférence, dans le sens où elle implique un rapport physique direct entre les individus (Wade et Arnold, 1980) ; il s'agit également de sélection interaction-dépendante selon la définition de Murphy (1998). Une telle compétition pourrait générer un certain coût, d'une part car les traits impliqués, parfois hypertrophiés, diminueraient la survie en ralentissant les individus, et d'autre part car les combats peuvent causer des blessures. Si de tels traits morphologiques et comportementaux ont évolué, c'est probablement parce qu'ils confèrent un avantage en termes de succès reproducteur via le succès d'accouplement.

Une autre forme de mécanisme pré-fertilisation est la compétition par exploitation ; celle-ci n'implique pas d'interactions directes entre les individus du même sexe (Murphy, 1998). Dans ce cas, ce n'est pas la capacité des individus à gagner les combats qui importe, mais plutôt leur capacité à s'approprier rapidement les femelles (Andersson et Iwasa, 1996). Par exemple, les mâles matures sexuellement ou arrivant sur la zone de lek (l'aire de parade chez certaines espèces) avant les femelles peuvent être avantagés. Cet avantage à la protandrie sur le succès d'accouplement a particulièrement été documenté chez les oiseaux (p. ex. Lozano et al., 1996; Møller et al., 2008). Lorsque les femelles sont dispersées dans l'environnement, et non regroupées au sein de la zone de lek, un autre moyen d'avoir l'avantage en termes de succès d'accouplement est de les localiser et les atteindre rapidement. Ainsi, les mâles de certaines espèces ont développé des organes sensoriels plus conséquents et/ou une mobilité accrue pour accéder aux femelles (Andersson et Iwasa, 1996). Par exemple, chez la baudroie *Cryptopsaras couesii*, les mâles ont des yeux plus grands et une forme plus allongée que les femelles. Ces traits dimorphiques pourraient leur conférer une meilleure localisation des femelles ainsi qu'un meilleur hydrodynamisme pour les rejoindre (Andersson, 1994). Enfin, cette compétition par exploitation peut se manifester par des comportements de gardiennage, nommés amplexus, en monopolisant la femelle bientôt réceptive, comme observés chez de nombreuses espèces de Pancrustacés (révisé pour les Crustacés dans Jormalainen, 1998 ; pour les insectes dans Simmons, 2001). Ce comportement de gardiennage atteint son paroxysme

chez certaines espèces de lépidoptères, où le mâle dépose une structure appelée sphragis lors de l'accouplement qui va clôturer l'organe génital femelle (Matsumoto, 1987), ou encore chez certaines espèces d'araignées, où le mâle mutile les parties génitales de la femelle pour empêcher les accouplements suivants (Mouginot et al., 2015).

1.6.1.2 Post-accouplement : féconder les gamètes

Les mécanismes de sélection intrasexuelle développés ci-dessus s'exercent sur les traits qui confèrent un meilleur succès d'accouplement via le nombre de partenaires sexuels. Néanmoins, rien ne garantit que ces accouplements donneront lieu à des descendants : il faut encore qu'il y ait rencontre et fécondation gamétique. La compétition continue donc au-delà de l'accouplement efficace (dans le cas des organismes à fécondation interne) s'il y a eu polygamie au sein du même épisode de reproduction (c-à-d plusieurs partenaires sexuels). On ne parle alors plus de compétition à l'échelle individuelle, mais de compétition à l'échelle gamétique, entre gamètes d'individus différents[4] (Parker, 1970). Du fait de l'anisogamie, ce sont les gamètes mâles qui vont entrer dans une course afin de féconder les gamètes femelles limitants. La compétition spermatique est donc liée au succès de fécondation, et certains de ses mécanismes seront brièvement passés en revue ici.

Une stratégie évidente pour remporter cette compétition à la fécondation est de relâcher de nombreux gamètes par éjaculat (Kvarnemo et Simmons, 2013). Il devient alors difficile de discriminer la sélection sur le nombre de gamètes qui se fait via la sélection sur la fertilité ou via la sélection sexuelle, comme évoqué précédemment. En effet, produire plus de gamètes signifie (i) avoir plus de potentiels futurs descendants par une relation directe (sélection via la fécondité) et (ii) être plus nombreux pour être plus compétitifs face aux gamètes issus d'autres individus et donc gagner la course à la fécondation (sélection sexuelle). Néanmoins, il a été par exemple montré que la taille des testicules, corrélée à la production de gamètes, était plus importante chez les espèces polygames par rapport aux espèces monogames (Simmons et Fitzpatrick, 2012). Cet effet de l'intensité de la compétition spermatique sur la production de gamètes semble bien démontrer que la compétition intrasexuelle joue un rôle dans l'évolution de ce trait.

Au-delà de la quantité de gamètes produits, leurs caractéristiques morphologiques ont également un effet sur leur compétitivité. Par exemple, des gamètes de plus grosse taille se déplacent dans le liquide séminal à une plus grande vitesse, étant moins sujet à la viscosité du milieu (Parker et al., 1972; Simmons et Fitzpatrick, 2012). Cet avantage aux gros spermatozoïdes peut par ailleurs conduire à l'évolution d'une diminution de l'anisogamie, ce qui peut en retour diminuer la force de la sélection intrasexuelle chez les mâles, comme montré chez la drosophile (Bjork et Pitnick, 2006). Également, chez certaines espèces de rongeurs, les mâles produisent des agrégats de spermatozoïdes, ce qui va pouvoir augmenter leur vitesse de déplacement et/ou augmenter la linéarité du déplacement. Ainsi, les spermatozoïdes peuvent

[4] A noter que la compétition peut également avoir lieu entre gamètes du même individu, mais ce mécanisme ne sera pas développé ici comme en dehors du cadre de la sélection sexuelle (Sutter et Immler, 2020).

coopérer entre eux afin d'être plus compétitifs (Fisher et al., 2014).

La qualité des gamètes joue également un rôle dans leur compétitivité, et certaines espèces seraient capables d'ajuster la proportion de spermatozoïdes viables par éjaculat selon le niveau de compétitivité perçu (c-à-d le nombre de mâles qui auraient inséminé la femelle ; Simmons et Fitzpatrick, 2012). Enfin, les protéines contenues dans le liquide séminal peuvent également avoir évolué de manière à augmenter la compétitivité des spermatozoïdes. En effet, il a été montré que certaines protéines augmentaient la vitesse de déplacement des gamètes, et il existe des preuves que plus l'intensité de la compétition spermatique est forte, plus les glandes protéïques sont sous forte sélection (Simmons et Fitzpatrick, 2012).

1.6.1.3 Importance relative des processus pré- versus post-accouplement

La plupart des études s'intéressant à la sélection sexuelle se focalisent sur le processus pré-accouplement ou sur le processus post-accouplement, ou encore sur la résultante de l'ensemble de ces processus (voir section 3.3). Une étude néanmoins s'est intéressée à partitionner l'action de la sélection sexuelle selon ces deux processus et à en mesurer l'importance relative chez la drosophile (Pischedda et Rice, 2012). Les auteurs ont ainsi trouvé que le succès de fécondation jouait autant que le succès d'accouplement dans le succès reproducteur des mâles. Néanmoins, lors qu'ils contrôlaient pour l'ordre de passage lors de l'accouplement des mâles, le succès de fécondation n'expliquait alors qu'environ 2% de la variance dans le succès reproducteur. En effet, les derniers mâles s'étant accouplés avec la femelle avaient beaucoup plus de chances que leurs gamètes fécondent les ovules. Par ailleurs, les auteurs n'ont pas détecté de corrélation significative entre les deux processus. Les mâles avec le meilleur succès d'accouplement n'avaient pas nécessairement le meilleur succès de fécondation, ce qui laisse à penser que différentes stratégies ont évolué chez cette espèce.

1.6.2 La sélection intersexuelle

Alors que la sélection intrasexuelle implique une compétition entre individus du même sexe pour avoir accès au nombre limité de partenaires sexuels et/ou gamètes de type opposé, la sélection intersexuelle agit dans le sens inverse. Le sexe limitant, face à une multitude de potentiels partenaires et/ou gamètes, exerce un choix (cryptique[5] ou non) sur ceux-ci.

Ainsi, les modèles théoriques de sélection sexuelle se sont en grande partie intéressés à comprendre l'évolution conjointe (i) d'un trait mâle sous préférence et (ii) du comportement femelle de choix pour ce trait (Kuijper et al., 2012). Par exemple, les parades et chants sont probablement des comportements qui ont évolué en partie sous l'action de la sélection intersexuelle pré-accouplement (Searcy et Andersson, 1986). Un autre exemple est la longueur et/ou la complexité de l'oviducte parfois observés, qui aurait probablement évolué sous l'action de la sélection intersexuelle post-accouplement (Keller et Reeve, 1995). Ce type

[5]Cette notion de choix cryptique des femelles a d'abord été avancé pour désigner le rôle que peuvent tenir les femelles dans l'issue de la compétition spermatique, en choisissant l'identité du sperme fécondant. De manière générale, ce terme désigne tous les mécanismes de choix non-évidents, passifs, et souvent difficilement discriminables des mécanismes de sélection intrasexuelle (Andersson et Simmons, 2006).

de trait permettrait ainsi de ralentir la fécondation et d'accumuler des gamètes provenant de différents partenaires sexuels, augmentant la probabilité d'acquérir un partenaire sexuel de « bonne qualité ». Par ailleurs, cela peut mener à une co-évolution entre les organes sexuels des deux sexes (p. ex. le fameux pénis en tire-bouchon chez le canard (Brennan et al., 2010).

Ce choix peut ainsi apporter des bénéfices directs (c-à-d un meilleur succès reproducteur de la femelle), des bénéfices indirects (c-à-d un meilleur succès reproducteur de ses descendants), ou encore aucun bénéfice (Kuijper et al., 2012). Dans ce dernier cas, le choix est alors simplement un sous-produit du système sensoriel. La préférence pour un trait a simplement évolué parce que le système sensoriel associé procure un avantage hors sélection sexuelle (p. ex. en termes de survie, pour les stratégies optimales de recherche de nourriture ; Fuller, 2009). A noter que ces mécanismes de bénéfices directs/indirects ne sont pas forcément mutuellement exclusifs.

1.6.2.1 Les bénéfices directs : meilleur succès reproducteur de la femelle

Les bénéfices directs au choix femelle du partenaire sexuel vont être directement en lien avec sa propre survie et/ou fécondité (Kuijper et al., 2012). Les mâles vont alors directement apporter des ressources à la femelle (p. ex. nourriture, territoire), ou une protection augmentant sa survie. Ils peuvent également procurer des soins parentaux aux descendants, ce qui augmentera leur chance de survie jusqu'à la première reproduction (Andersson et Simmons, 2006; Jones et Ratterman, 2009). Par exemple, chez la mésange bleue, il semblerait que les plumages plus jaune-clair soient utilisés comme indicateur d'une meilleure capacité à trouver les chenilles (riches en carotènes), qui sont à la base de leur régime alimentaire (Senar et al., 2002).

1.6.2.2 Les bénéfices indirects : meilleur succès reproducteur des descendants

Historiquement, ce sont les bénéfices indirects du choix femelle qui ont en premier lieu gagné l'attention des chercheurs. Ainsi, au début du XXème siècle, Fisher commença à s'intéresser au mécanisme de préférence sexuelle. A la manière de Darwin, il verbalisa principalement ses idées d'abord à travers un article, puis un livre (Fisher, 1915, 1930), bien qu'il construisit également un modèle théorique mais qui resta privé au sein d'un échange épistolaire (Henshaw et Jones, 2020).

Via la sélection sexuelle

Cette théorie, nommée processus d'emballement de Fisher, stipule qu'il y a coévolution entre un trait et la préférence pour ce trait, dans une boucle de rétroaction positive jusqu'à équilibre où le bénéfice apporté en termes de succès d'accouplement est égal au coût associé à la production du trait sous préférence (Fisher, 1915, 1930). La descendance mâle des femelles qui ont une préférence pour le trait va alors également porter le trait attractif (on parle de *sexy son*), et ces descendants vont à leur tour avoir un fort succès d'accouplement, comme leur père. Il y a alors une corrélation génétique entre (i) le comportement de choix et (ii)

le trait choisi, puisque les femelles qui exercent ce choix produisent des descendants portant les deux gènes (Kuijper et al., 2012). Le processus d'emballement de Fisher inclut donc un bénéfice indirect du choix femelle (génération G_n) par le plus fort succès reproducteur de ses fils via la sélection sexuelle (génération G_{n+1} ; Figure 2) et donc plus de descendants à la génération G_{n+2}.

Via la sélection de viabilité ou la fécondité

Un autre bénéfice indirect à l'exercice d'un choix du partenaire sexuel consisterait en une meilleure qualité génétique des descendants dans le sens où ceux-ci vont avoir une meilleure survie et/ou fécondité (Kuijper et al., 2012) Alors que le processus d'emballement de Fisher ne requiert que la présence (i) d'un gène codant pour un trait et (ii) d'un gène codant pour une préférence pour ce trait, ici il y a également présence d'une variation dans la qualité des génotypes mâles. Dans cette théorie « des bons gènes », on retrouve le principe du handicap introduit par (Zahavi, 1975). Ce principe stipule qu'un trait attractif conférant intrinsèquement une plus faible survie et/ou fécondité (p. ex. des ornements exagérés) constitue un signal honnête pour les femelles, dans le sens où seuls les mâles arborant ce trait sont de bonne qualité génétique. On peut ensuite différencier deux types de modèles : (i) indicateurs condition-dépendants et (ii) indicateurs condition-indépendants (Jones et Ratterman, 2009).

Dans les modèles indicateurs condition-dépendants, le trait sous préférence va être moins coûteux à exprimer pour les mâles qui ont une bonne qualité génétique. Ces mâles vont alors avoir des traits exagérés, qui vont donc être préférés par les femelles en tant qu'handicap révélateur. Dans les modèles indicateurs condition-indépendants, le trait est aussi coûteux à exprimer peu importe la qualité génétique du mâle en question. En conséquent, les mâles qui portent ce trait ont survécu et donc ont une bonne qualité génétique (Jones et Ratterman, 2009; Kuijper et al., 2012).

Cependant, un paradoxe réside dans cette théorie des bons gènes, et qui concerne à la fois le modèle condition-dépendant et le modèle condition-indépendant. Ce paradoxe, nommé paradoxe du Lek, consiste en l'érosion de la variation génétique pour les gènes qui codent pour une bonne survie et/ou fécondité (Kotiaho et al., 2008). En effet, si les femelles exercent un choix sur un trait, cette sélection directionnelle sur le trait devrait résulter en une diminution de la variance additive génétique. Or, le choix du trait réside dans le fait qu'il est associé à une bonne qualité génétique, mais s'il n'y a plus de variation comment expliquer que cette préférence pour le trait soit maintenue ? Il faudrait alors que la sélection directionnelle sur le trait choisi par les femelles soit contrebalancée par un autre processus qui empêche l'érosion de la variance génétique (Kotiaho et al., 2008). Une explication plausible serait que la qualité en termes de survie/fécondité soit codée par de nombreux gènes pléiotropes (Rowe et Houle, 1996).

1.7 Contextualiser la sélection sexuelle

1.7.1 Caractéristiques de la population

L'intensité de la sélection sexuelle devrait dépendre du nombre d'individus/gamètes d'un sexe donné en compétition pour l'accès à un pool limité d'individus/gamètes de l'autre sexe. De cette manière, le sexe-ratio d'une population peut influencer l'intensité de la sélection sexuelle (p. ex. un sexe-ratio fortement biaisé vers les mâles devrait d'autant plus augmenter la compétition entre ceux-ci ; Kokko et al., 2012). La notion de sexe-ratio opérationnel a ainsi été introduite par Emlen et Oring (1977) : plutôt que de s'intéresser au ratio de mâles sur femelles dans une population, ils stipulent que le ratio de mâles sexuellement actif sur femelles sexuellement actives à un moment donné est plus informatif sur le degré de monopolisation potentiel des partenaires sexuels. Une étude chez *Syngnathus typhle* dans laquelle les auteurs ont manipulé le sexe-ratio (et la densité) des populations expérimentales a ainsi montré qu'un sexe-ratio biaisé vers un des deux sexes entraînait une sélection sexuelle globale, mesurée par les métriques classiques de Bateman, plus forte chez ce sexe (Aronsen et al., 2013).

1.7.2 Caractéristiques spatio-temporelles

Néanmoins, et comme pour la sélection naturelle, la sélection sexuelle est également à contextualiser dans un environnement donné. Par exemple, il a été montré chez le passereau *Calamospiza melanocorys* que la direction et l'intensité de la sélection sur les traits mâles (p. ex. couleur des plumes) changeaient drastiquement d'année en année (Chaine et Lyon, 2008). Ce patron a été interprété comme résultant d'une plasticité phénotypique sur les préférences des femelles pour ces traits. Une autre étude portant sur l'escargot hermaphrodite *Lymnaea stagnalis* (voir section 2.1.1) a également quantifié la sélection sexuelle sur plusieurs fenêtres consécutives de leur cycle de vie. Les auteurs montrent ainsi que la force de la sélection sexuelle, mesurée par le gradient de Bateman, change au cours du temps et ce particulièrement pour la fonction femelle (Hoffer et al., 2017). Concernant les caractéristiques écologiques, Halfwerk et al. (2019) ont montré que l'urbanisation (qui augmente la pollution sonore et lumineuse) augmentait la compétition entre mâles pour l'accès aux partenaires sexuels chez l'amphibien *Physalaemus pustulosus*. Cette pression de sélection accrue en milieu urbain a ainsi conduit à l'évolution d'un chant plus complexe qu'en milieu naturel. Dans le sens contraire, Järvenpää et Lindström (2004) ont montré que la turbidité de l'eau diminuait la variance dans l'acquisition des femelles (c-à-d, opportunité de sélection sexuelle), les plus petits mâles ayant de manière plus égale accès aux partenaires sexuels.

2. La sélection sexuelle généralisée au-delà des modèles classiques d'études

Dans la section précédente, l'émergence de la théorie de la sélection sexuelle et sa sophistication ont été abordées d'un point de vue historique. Les animaux à sexes séparés en tant que modèle d'études ont ainsi très majoritairement dirigé les réflexions autour de la théorie de la

sélection sexuelle. Cependant, la théorie de la sélection sexuelle vise à expliquer l'évolution de traits conférant un avantage en termes d'accès aux partenaires sexuels/gamètes. Une telle théorie ne peut donc prévaloir que si elle s'applique à l'ensemble des organismes sexués. Pourtant, encore trop peu d'études s'intéressent aux organismes avec des systèmes de reproduction particuliers, une des raisons évoquées étant que la sélection sexuelle s'exercerait de manière discrète, dans le sens où les mécanismes de sélection post-éjaculation seraient prédominants (Beekman et al., 2016). Dans cette partie, les organismes présentant des systèmes de reproduction singuliers vis-à-vis des modèles animaux classiquement utilisés dans les études sur la sélection sexuelle seront abordés.

2.1 Les cas particuliers chez les animaux

2.1.1 Animaux hermaphrodites : les sexes au sein d'un même individu

C'est plus d'un siècle après la parution du livre fondateur de Darwin que la théorie de la sélection sexuelle fut abordée au-delà du prisme des organismes gonochoriques (c-à-d à sexes séparés). Charnov (1979) avança alors que les fonctions mâle et femelle des organismes hermaphrodites devrait également obéir aux principes de Bateman. En effet, du fait de l'anisogamie, la fonction femelle devrait de la même manière être limitée par les ressources, tandis que la fonction mâle devrait être limitée par l'accès aux gamètes. Néanmoins, si l'application de la sélection sexuelle aux organismes hermaphrodites ne pose pas de problème conceptuel, l'expression de traits sexe-spécifiques via les deux fonctions mâles et femelles devrait être plus contrainte (Morgan, 1994). Le processus d'emballement de Fisher se voit donc également contraint, puisque les individus expriment à la fois le gène de la préférence et le gène codant pour le trait. Comme ce dernier peut avoir un effet négatif sur la viabilité si il est exagéré, cela va également réduire la sélection sur la préférence via la fonction femelle, comme les deux gènes sont portés par le même individu (Skogsmyr et Lankinen, 2002). L'expression des deux sexes au sein d'un même individu peut également entraîner des conflits sexuels, si les optimums de traits en termes de sélection sexuelle divergent entre les sexes (Leonard, 2006). Malgré ces contraintes, l'action de la sélection sexuelle chez les hermaphrodites n'est plus à montrer tant les preuves empiriques sont nombreuses (révisé dans Leonard, 2006).

2.1.2 Animaux à fécondation externe : les gamètes au centre de la sélection sexuelle

Chez les organismes à fécondation externe, il n'y a pas d'accouplements. Ainsi, la plupart du temps, les individus n'interagissent pas directement physiquement entre eux, seulement leurs gamètes (Levitan, 2010). Il existe néanmoins un continuum de stratégies entre la fécondation interne avec interaction franche entre individus, et la fécondation externe sans aucun contact. Par exemple chez certains amphibiens à fécondation externe, les mâles vont pratiquer l'amplexus. Ce rapprochement physique va ainsi permettre une plus grande probabilité de fécondation des œufs une fois expulsés (Jamieson, 2003). Il existe également des espèces aquatiques dont les œufs sont retenus par les femelles, et où seuls les spermatozoïdes diffusent dans l'eau (*sperm-casting species* ; Bishop, 2006). Nous nous intéresserons ici à un

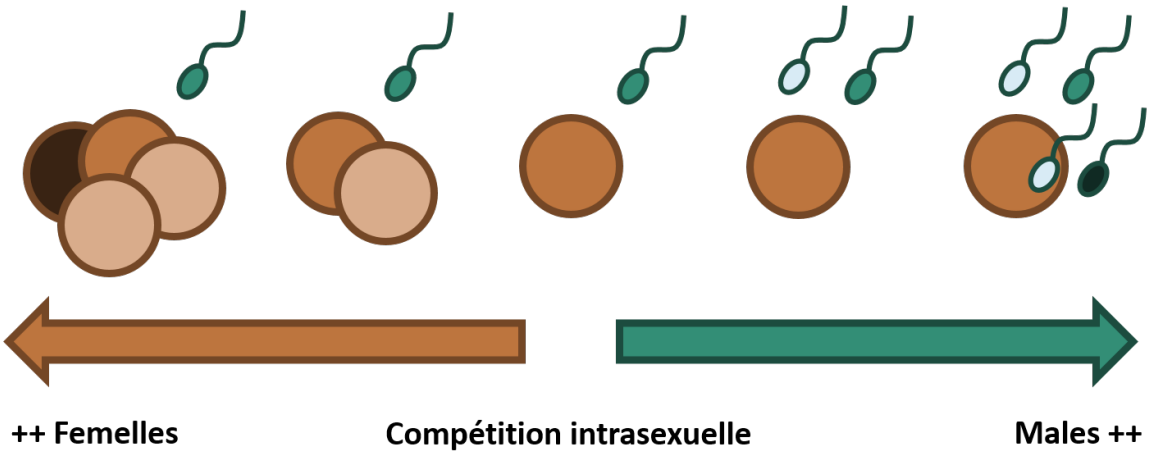


Figure 4: Exemples de situations de rencontre gamétique chez une espèce anisogame. Les spermatozoïdes mâles sont représentés en vert et les œufs femelles en rouge. La compétition intrasexuelle est ainsi de plus en plus forte chez les mâles vers la droite, parce que le sexe-ratio est plus biaisé mâle et les gamètes sont issus de plusieurs mâles différents. La situation inverse se produit vers la gauche, avec une compétition intrasexuelle plus forte chez les femelles. Schéma adapté de Levitan (2010).

cas extrême d'animaux à fécondation externe, qui se différencie drastiquement des animaux avec accouplements : le cas des organismes aquatiques qui délivrent leurs gamètes dans le milieu de manière diffuse, comme les oursins (*broadcast-spawning species*, Levitan, 2010).

En raison de l'absence d'accouplement, la probabilité de rencontres des gamètes est régie en grande partie par la turbulence du milieu (Beekman et al., 2016). Cette diffusion peut alors amener à une grande diversité de situations où la compétition intrasexuelle est plus ou moins forte, selon l'identité et la quantité relative des gamètes des deux sexes qui se rencontrent (Figure 4 ; Levitan, 2010).

Ainsi, et contrairement à la plupart des animaux à fécondation interne (Janicke et al., 2016), le sexe limitant n'est pas toujours la femelle, bien que du fait de la plus grande quantité de spermatozoïdes libérés par individu comparé aux nombre d'ovules libérés par individu, cette situation devrait être plus rare. La compétition intrasexuelle peut donc être marquée dans les deux sexes et les traits femelles liés à l'accès aux gamètes mâles peuvent être sous sélection sexuelle (Levitan, 1993, 2010). Une étude a ainsi montré que la force de la sélection sexuelle chez les deux sexes était densité-dépendante (Levitan, 2004). A faible densité, les mâles comme les femelles sont limités par le nombre de gamètes dans leur succès reproducteur. A densité intermédiaire, on retrouve les attendus de Bateman, comme chez les animaux à fécondation interne, avec les femelles qui saturent dans leur succès reproducteur malgré l'augmentation du nombre de gamètes du sexe opposé. Enfin, à densité élevée, il y a un désavantage pour les femelles, absent chez les mâles, à être saturées de gamètes du sexe opposé (Levitan, 2004, 2008). En effet, cette situation peut entraîner de la polyspermie, et donc une sélection sexuelle négative sur des traits liés à l'attraction des gamètes mâles.

Cela soulève la question des types de traits sous sélection sexuelle chez ces organismes.

Chez les animaux avec un rapprochement physique entre les individus pour la fécondation, il peut y avoir sélection sexuelle sur les traits qui permettent d'augmenter le nombre de partenaires sexuels via les accouplements. Si cet avantage en termes de succès d'accouplements résultait en un meilleur succès reproducteur, nous avons vu qu'il peut alors avoir évolution de caractères sexuels secondaires dimorphiques, si les pressions de sélection sexuelle diffèrent entre mâles et femelles (Janicke et al., 2016; Mori et al., 2017). Chez les organismes à fécondation externe, la présence d'un dimorphisme sexuel sur les traits à l'échelle de l'individu est plus rare (Levitan, 2010). En effet, les traits sous sélection sexuelle vont plutôt se situer à l'échelle gamétique car c'est à cette échelle que la variation phénotypique aura un impact sur le succès de fertilisation (Levitan, 1998), comme la taille des œufs, la quantité de gélée glycoprotéïque - qui augmente la captation des spermatozoïdes -, ou la vélocité des spermatozoïdes (Levitan, 1993; Levitan et Irvine, 2001).

2.2 Extension de la théorie de la sélection sexuelle aux plantes

Dans la section précédente, les modes de reproduction sexuée s'écartant des modèles classiques étudiés chez les animaux ont été évoqués. Ces caractéristiques, l'hermaphrodisme et la fécondation externe, sont des patrons symptomatiques chez les angiospermes, qui représentent 91.5% des espèces de plantes terrestres (Lughadha et al., 2016). Dans cette section, le propos sera focalisé uniquement sur ces plantes à fleurs, en raison de leur prépondérance, mais aussi car les études sur la sélection sexuelle chez les plantes se sont très majoritairement focalisées sur celles-ci (mais pour un exemple chez une bryophyte, voir Johnson et Shaw, 2016).

2.2.1 Réticences a priori sur l'application de la sélection sexuelle aux plantes

La diversité des traits floraux observée dans la phylogénie des angiospermes soulève la question du rôle de ces traits dans l'accès à la reproduction (Harder et Johnson, 2009; Barrett, 2010). Pourtant, l'application de la théorie de la sélection sexuelle aux plantes a longtemps été controversée, pour plusieurs raisons.

La première raison est que la grande majorité des angiospermes sont hermaphrodites (Renner, 2014; Käfer et al., 2017). Ce problème n'en est un qu'en surface car, comme vu précédemment pour les animaux hermaphrodites, la sélection sexuelle peut agir par le biais des fonctions mâle et femelle des individus (Charnov, 1979; Morgan, 1994). L'hermaphrodisme limiterait alors seulement l'évolution des traits sous sélection sexe-spécifique, par rapport à une situation où les sexes sont séparés (Morgan, 1994). Il existe par ailleurs une grande diversité des systèmes de reproduction chez les plantes, avec des fonctions sexuelles réunies ou non au sein d'une même fleur et/ou d'un même individu (Käfer et al., 2017). Ainsi, chez les plantes dioïques qui représente 5 à 6% des angiospermes (Renner, 2014), on suppose que la sélection sexuelle pourrait être à l'origine d'un dimorphisme sexuel de la même manière que pour les animaux (Moore et Pannell, 2011).

La seconde raison est que les plantes sont des organismes sessiles, et donc qu'il n'y a

pas d'interaction directe entre individus lors des évènements de reproduction. Pourtant, même s'il n'y a pas d'accouplements ou de combats, les individus peuvent tout de même entrer en compétition les uns avec les autres pour l'accès aux gamètes du sexe opposé (c-à-d compétition interaction-indépendante ; Murphy, 1998). Par ailleurs, une autre conséquence de la sessilité est que les plantes ne peuvent pas chercher activement un partenaire sexuel, contrairement aux animaux. De ce fait, il est possible que la fonction femelle, tout comme la fonction mâle, soit limitée par l'accès aux partenaires sexuels : on parle de limitation pollinique, une situation courante dans les populations naturelles d'angiospermes (Knight et al., 2005). Comme nous avons pu le voir chez les organismes à fécondation externe dans les situations où le sperme est limitant (Levitan, 1993, 2010), ce patron peut alors résulter en une sélection intrasexuelle accrue par la voie femelle (Burd, 1994).

La troisième raison est que les plantes n'ont pas de système nerveux, et donc n'ont pas de comportement qui résulterait d'un choix éventuel. C'est un argument qu'avait déjà avancé Darwin pour justifier le fait qu'il ne pensait pas que la sélection sexuelle puisse s'appliquer aux organismes qu'il considérait comme « inférieurs » dans le sens où ils n'ont pas de système nerveux développé (Darwin, 1871). Cet argument s'appliquait principalement selon lui au choix du partenaire sexuel, souvent exercé par les femelles. Il est effectivement possible que la sélection intersexuelle soit relativement moins importante chez les plantes par rapport aux animaux, quoi qu'il puisse également y avoir des choix cryptiques (voir section 2.2.2). Toutefois, et comme évoqué dans le paragraphe précédent, il peut bien y avoir sélection intrasexuelle. Chez les plantes zoogames, dont la pollinisation est assurée par un vecteur biotique, cette compétition intrasexuelle pour l'accès aux gamètes du sexe opposé devrait inclure une compétition pour attirer les pollinisateurs (Kaul et Raina, 2020). Une section sera ainsi consacrée aux traits floraux attractifs et aux pollinisateurs, en tant que thématique centrale de cette thèse, plus loin dans l'introduction (voir section 2.2.3).

La quatrième raison est qu'il n'existerait pas de caractères sexuels secondaires à proprement parler chez les plantes, la structure florale étant également le siège des caractères sexuels primaires (Grant, 1995). Néanmoins, et comme nous l'avons vu pour les animaux, l'évolution des caractères sexuels primaires peut souvent être le produit de l'action combinée de la sélection de fécondité et de la sélection sexuelle (Simmons et Fitzpatrick, 2012). Par ailleurs, il est possible de séparer les structures florales en deux catégories : (i) l'androcée et le gynécée, qui constitueraient respectivement les caractères sexuels primaires mâle et femelle, et (ii) le périanthe, composé de la corolle (c-à-d l'ensemble des pétales) et du calice (c-à-d l'ensemble des sépales), qui constituerait les caractères sexuels secondaires (Lloyd et Webb, 1977; Raven et al., 2014).

Il ne semble donc y avoir a priori aucune raison à ce que la sélection sexuelle ne joue pas un rôle prépondèrant dans l'évolution des traits floraux chez les angiospermes. Du fait que les plantes sont anisogames, et que la quantité de pollen produit excède largement la quantité d'ovules, une sélection sexuelle différentielle entre les sexes pourrait également exister, de la

même façon que chez les animaux à sexes séparés (Cruden, 2000; Tejaswini et al., 2001; Moore et Pannell, 2011). Les études sur la sélection sexuelle ont ainsi progressivement amené à une légitimation de l'application de cette théorie aux plantes (Encadré 4).

Encadré 4: Historique des recherches sur la sélection sexuelle chez les plantes

Darwin déjà évoquait rapidement les plantes dans son livre où il développait sa théorie de la sélection sexuelle, alors qu'il discutait de la quête par les mâles d'un partenaire sexuel (Darwin, 1871) :

> *« We are naturally led to enquire why the male in so many and such widely distinct classes has been rendered more eager than the female, so that he searches for her and plays the more active part in courtship. It would be no advantage and some loss of power if both sexes were mutually to search for each other; but why should the male almost always be the seeker? With plants, the ovules after fertilisation have to be nourished for a time; hence the pollen is necessarily brought to the female organs—being placed on the stigma, through the agency of insects or of the wind, or by the spontaneous movements of the stamens; and with the Algæ, &c., by the locomotive power of the antherozooids. »*

Bien qu'il était réticent à appliquer la sélection sexuelle aux organismes dits « inférieurs », il semblait donc reconnaître que certains mécanismes s'appliquaient néanmoins à tous les organismes sexués. Dans ce passage de son livre, il fait ainsi implicitement référence au fait que les mâles sont en théorie plus limités par l'accès aux partenaires sexuels, et donc qu'il s'agit souvent du sexe à la recherche de partenaires (même si cela se fait passivement chez les plantes). Après quelques décennies sans avancée sur ces questions, Bateman dans son article fondateur fit également référence aux plantes (Figure 5 ; Bateman (1948)) :

> *« In dioecious plants or moneocious plants where the sexes are separated the results of intra-masculine selection might be more obvious. A possible example here is the insect pollinated sallow* (Salix caprea) *in which the male catkins are brightly coloured whereas the female catkins are inconspicuous (though both produce nectar). »*

Figure 5: Fleurs du Saule des chèvres, *Salix caprea* (mâle en haut, femelle en bas). Exemple avancé par Bateman pour illustrer la présence d'un dimorphisme sexuel chez les plantes dioïques en tant que résultante d'une potentielle sélection sexuelle plus forte sur les traits floraux mâles. Crédit photos : D. Busti (ENS de Lyon).

Il ne doutait ainsi pas que la sélection sexuelle sous la forme d'une compétition accrue entre les mâles, puisse s'appliquer à tous les organismes anisogames, donc aux plantes. Néanmoins, il émettait également des réserves quant au fait que la sélection sexuelle puisse s'exercer sur les traits floraux des deux sexes, du fait de l'hermaphrodisme et de la sessilité des plantes.

Seulement 30 ans plus tard, Lloyd et Webb (1977) utilisaient des arguments similaires pour expliquer pourquoi les plantes n'avaient pas des caractères sexuels secondaires aussi extravagants que les animaux. Selon eux, l'absence de choix par les femelles et de combats entre mâles induisait une sélection sexuelle plus faible chez les plantes ; néanmoins, ils ne niaient pas l'existence d'un tel mode de sélection chez celles-ci. La même année, Janzen (1977) avançait des exemples de mécanismes qui pourraient s'apparenter à une forme de choix passif par les femelles (p. ex. réceptivité du stigmate), sans pour autant parler de sélection sexuelle.

Les publications mentionnant la sélection sexuelle chez les plantes commencèrent à devenir alors plus fréquentes. Deux ans plus tard, Willson (1979) publiait ainsi un article explicitement appelé *Sexual selection in plants*, et discutait de l'implication que pourrait avoir la sélection sexuelle dans l'émergence de la dioécie. La même année, l'article de Charnov (1979) levait les réticences vis-à-vis de l'application de la sélection sexuelle aux organismes hermaphrodites, et donc à la majorité des plantes. Un an plus tard, dans un article également consacré à la dioécie, Bawa (1980) parlait explicitement de sélection intra- et intersexuelle, tout en mentionnant les attendus de Bateman liés à l'anisogamie.

En 1983, un livre et un chapitre de livre marquèrent un tournant dans la conception de la sélection sexuelle appliquée aux plantes (Stephenson et Bertin, 1983; Willson et Burley, 1983). Au sein de ces ouvrages, l'équivalence des mécanismes de sélection intra- et intersexuelle chez les plantes, jusqu'alors uniquement documentés chez les animaux (voir section 1.6), était abordée (voir section 2.2.2). Ainsi, comme le disaient si bien les autrices Willson et Burley (1983) dès les premières pages de leur livre : *« Plants are not the totally passive and undiscriminating recipients of sperm that they are often thought to be. »*.

Les études s'intéressant explicitement aux mécanismes de la sélection sexuelle se multiplièrent alors (p. ex. Queller, 1983; Galen et al., 1986; Marshall et Ellstrand, 1986, 1988). Finalement, en 1994, trois articles majeurs se sont attelés à uniformiser la théorie de la sélection sexuelle aux plantes et aux animaux (Arnold, 1994a,b; Willson, 1994), notamment en discutant les implications du principe de Bateman dans la reproduction des plantes. Depuis, et malgré quelques réticences (p. ex. Grant, 1995), il est largement admis que la sélection sexuelle s'applique également aux plantes (Tejaswini et al., 2001; Skogsmyr et Lankinen, 2002; Delph et Ashman, 2006; Jones et Ratterman, 2009; Moore et Pannell, 2011; Barrett et Hough, 2012; Lankinen et Karlsson Green, 2015; Beekman et al., 2016). Néanmoins, les études explicitement portées sur la sélection sexuelle chez les plantes restent relativement rares : ainsi entre 2004 et 2014, il a été estimé qu'au moins huit fois plus d'études portant sur les animaux ont été publiées par rapport à celles sur les plantes (Lankinen et Karlsson Green, 2015).

2.2.2 Equivalence des mécanismes de la sélection sexuelle chez les plantes

Dans cette partie, nous verrons comment les différents mécanismes impliqués dans la sélection intra- et intersexuelle et décrits préalablement chez les animaux, trouvent leurs équivalences chez les plantes. Par souci de simplicité, nous parlerons de manière générale de mâles et de femelles. Néanmoins, la plupart des angiospermes étant hermaphrodites (Renner, 2014; Käfer et al., 2017), ces termes génériques (hors exemples concrets) engloberont les notions de fonction mâle et fonction femelle.

2.2.2.1 Sélection intrasexuelle

De la même manière qu'on peut différencier les mécanismes pré- et post-accouplement chez les animaux, on peut différencier les mécanismes pré- et post-pollinisation chez les plantes.

Pré-pollinisation

- *Dépendant du vecteur de pollinisation*

Chez les mâles comme chez les femelles, certaines adaptations impliquées dans la sélection intrasexuelle pré-pollinisation dépendent du vecteur de la pollinisation. On distingue ainsi deux types de vecteurs chez les plantes à fleurs : les vecteurs abiotiques (c-à-d le vent ou très rarement l'eau Ackerman, 2000) et les animaux (Ollerton, 2017).

Chez les espèces anémogames, qui représentent environ 18% des familles d'angiospermes (Ackerman, 2000), les transferts de pollen sont assurés par le vent, et donc la pollinisation est non dirigée. Le parallèle peut être ainsi fait avec les espèces animales aquatiques et sessiles à fécondation externe (Beekman et al., 2016), dont les spermatozoïdes diffusent dans l'eau et où les œufs sont retenus par les femelles (*sperm-casting species* ; Bishop, 2006). Une différence majeure entre ces deux systèmes est alors le milieu dans lequel diffuse/disperse les gamètes mâles : l'eau pour ces espèces animales, l'air pour les plantes anémophiles. Les traits qui favorisent une dispersion plus importante des grains de pollen vont être favorisés, permettant ainsi d'avoir accès à un plus grand nombre d'ovules. Ainsi, chez l'espèce dioïque *Mercurialis annua*, il a été montré qu'il y avait sélection sur la taille de pédoncules mâles par compétition intrasexuelle car ils sont liés à la distance de dispersion du pollen (Tonnabel et al., 2019a).

Chez les espèces zoogames, qui représentent environ 85% des angiospermes (Ollerton et al., 2011), les transferts de pollen sont assurés par un troisième protagoniste : le pollinisateur. Puisqu'il y a notion d'attraction, le parallèle peut ainsi être fait entre espèces zoogames et animaux à fécondation interne ou à fécondation externe mais avec rapprochement entre individus (c-à-d dispersion dirigée ; Parker, 2020). Les individus les plus attractifs pour les pollinisateurs devraient donc être favorisés dans la compétition intrasexuelle, et la sélection devrait s'exercer sur les traits liés à l'exportation (mâles) ou à la réception du pollen (femelles ; Burd, 1994; Moore et Pannell, 2011). Les traits floraux associés à l'attractivité des pollinisateurs peuvent alors être sous sélection sexuelle chez les deux sexes. Etant donné que la sélection sur traits floraux jouant un rôle dans l'attraction des pollinisateurs est au cœur de ce travail de thèse, une section particulière sera dédiée aux différents types de traits et à leur particularité plus loin dans ce manuscrit (voir section 2.2.3). Comme il n'y a pas d'interaction physique possible entre les individus, il s'agira généralement d'une compétition par exploitation (des pollinisateurs ; Murphy, 1998). Cette compétition par exploitation peut également se manifester sans la notion d'attractivité, par le biais des traits qui impactent l'ajustement entre les structures reproductrices de la fleur et le pollinisateur (à la manière de la coévolution entre organes génitaux chez les animaux). Ces traits affectent alors la quantité de pollen déposé sur le corps du pollinisateur et/ou le stigmate.

En dehors de la compétition par exploitation, un cas a priori unique et manifeste de compétition par interférence a été reportée chez les plantes (Cocucci et al., 2014). Chez *Morrenia odorata*, les grains de pollen sont agrégés en structures appelées pollinies, elles-mêmes arrangées en paires au sein de pollinaires (Figure 6). Ces pollinaires vont s'accrocher au glossa (extrêmité du proboscis) de l'insecte lorsque celui-ci visite une fleur. De plus, les

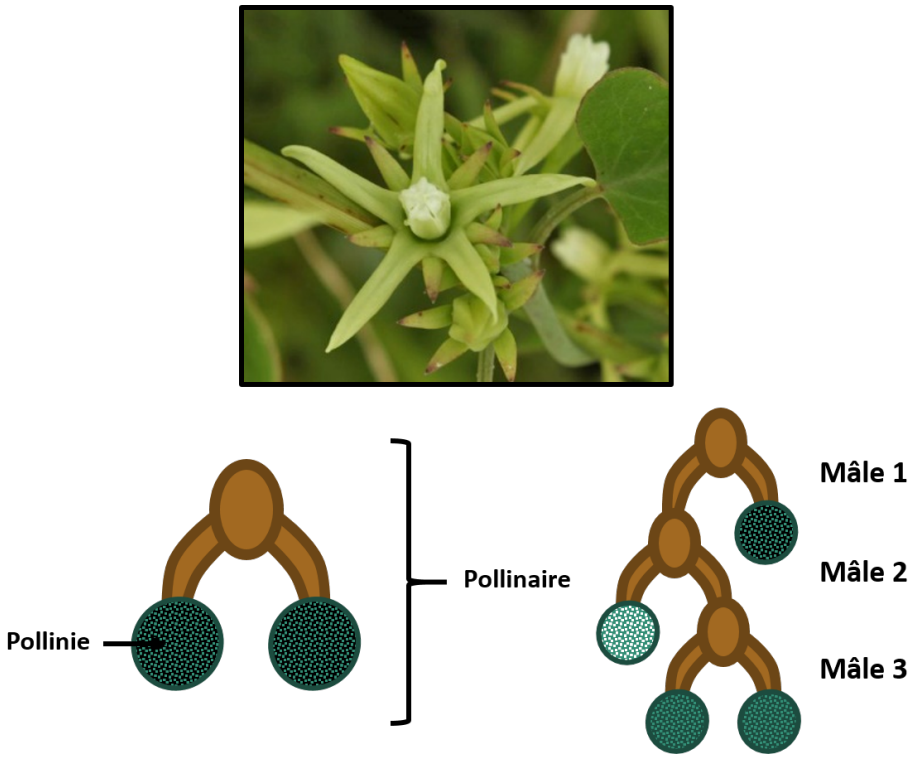


Figure 6: Photo d'une fleur de *Morrenia odorata*, structure d'un pollinaire (à gauche) et chaîne de pollinaires (à droite). Un pollinaire est constitué de deux pollinies, qui contiennent les grains de pollen. Lorsqu'une pollinie a été retirée, d'autres pollinaires peuvent s'insérer et former une chaîne de pollinaires issus de différents mâles. Photo de l'*Instituto de Botanica Darwinion* (Argentine).

pollinaires peuvent également s'accrocher entre eux, formant ainsi une chaîne de pollinaires accroché au glossa du pollinisateur. Ainsi, la dernière fleur visitée aura son pollinaire au bout de la chaîne, maximisant alors les chances que le pollen de ses pollinies féconde un ovule puisqu'il sera présenté en premier au style de la prochaine fleur visitée.

- *Indépendant du vecteur de pollinisation*

Il existe également des adaptations qui sont indépendantes du vecteur de pollinisation, et qui peuvent se vérifier peu importe le système. On retrouve ainsi de la protandrie chez les plantes comme pour les animaux. Les mâles, en fleurissant avant les femelles, augmentent la probabilité de féconder leurs ovules en étant avancés dans leur phénologie de floraison au moment de la floraison des femelles (p. ex. pour des espèces hermaphrodites O'Connell et Johnston, 1998; De Cauwer et al., 2012; Austen et Weis, 2016 ; révisé pour des espèces dioïques dans Forrest, 2014). Il est également possible que la sélection sur la date de floraison soit plus forte pour les espèces zoogames que les espèces anémogames. En effet, la diversification des phénologies entre individus pollinisés par des espèces généralistes devrait réduire la compétition pour l'accès aux pollinisateurs (Bolmgren et al., 2003; Elzinga et al., 2007; Munguia-Rosas et al., 2011).

Aussi, certaines adaptations des femelles permettent d'augmenter l'efficacité et/ou la durée de la phase de pollinisation (p. ex. augmentation de la surface du stigmate ou al-

longement de la fenêtre de réceptivité du stigmate (Kaul et Raina, 2020). Ces adaptations ont potentiellement émergé sous l'influence de la sélection intrasexuelle, bien qu'il soit difficile de la discriminer de la sélection intersexuelle dans ce cas précis.

Post-pollinisation

Concernant les mécanismes post-pollinisation, et à la manière de la compétition spermatique, la compétition pollinique va avoir lieu au moment de la fécondation[6] des ovules femelles, peu importe le vecteur de pollinisation (Moore et Pannell, 2011). Ainsi, la vitesse de croissance du tube pollinique peut par exemple être soumise à la sélection sexuelle (Snow et Mazer, 1988; Snow et Spira, 1991), et a montré qu'elle augmentait le succès reproducteur des mâles en gagnant la compétition pollinique (Pasonen et al., 1999). Cette vitesse de croissance du tube pollinique, mais également la capacité à germer du grain de pollen, ont d'ailleurs été montrés comme étant des traits héritables dans plusieurs systèmes, ce qui permettrait une évolution par sélection sexuelle (Sari-Gorla et al., 1992; Lankinen et al., 2009). A noter qu'une étude récente sur *Dalechampia scandens* s'est intéressée à l'effet du nombre de pères dans la compétition pollinique, en ne faisant varier que la diversité du pollen sans en faire varier la quantité (un facteur très souvent confondant dans ce genre d'études). Les auteurs n'ont cependant pas trouvé d'effet du nombre de pères sur le nombre ou la qualité des descendants au stade sporophytique, ce qui questionne le rôle de la compétition pollinique chez cette espèce (Pélabon et al., 2016).

Par ailleurs, les mâles de certaines espèces produisent des grains de pollen concaténés en paquets, appelés polyades. C'est notamment le cas chez le genre *Acacia* où il existe un polymorphisme au niveau du nombre de grains de pollen impliqués (Kenrick et Knox, 1982). Cette propriété pourrait également avoir évolué du fait de son lien avec la compétitivité des mâles pour la fécondation des ovules.

2.2.2.2 Sélection intersexuelle : choix cryptique des femelles

Nous nous intéressons ici aux traits qui pourraient affecter la qualité du partenaire sexuel. Ce processus de sélection du partenaire sexuel est passif, on parle de choix cryptique. Ces choix peuvent se manifester à deux niveaux : avant la fécondation des ovules, ou après la fécondation à travers des processus d'avortements sélectifs.

Pré-fécondation

Les adaptations femelles qui permettent d'augmenter la quantité de pollen reçu (p. ex. surface du stigmate) pourraient avoir évolué, entre autres, sous l'action de la sélection intersexuelle (Kaul et Raina, 2020). En effet, augmenter la quantité de pollen reçue permet souvent également d'augmenter la diversité de grains de pollen reçue, et donc d'augmenter

[6]Chez les plantes, et contrairement aux animaux, le gamète mâle, produit par les anthères, est constitué de deux nucleii. L'un de ces nucleii servira à féconder l'oosphère, qui est le strict équivalent des ovules chez les animaux, pour produire le zygote. L'autre nucleus quant à lui fécondera la cellule centrale à deux noyaux, qui se développera en endosperme, fournissant les ressources nutritives au zygote (Raven et al., 2014).

la probabilité de recevoir du pollen de partenaires sexuels de meilleure qualité. On pourrait alors s'attendre à ce que le rôle de la sélection intrasexuelle versus sélection intersexuelle dans l'évolution de ce type de traits soit dépendant du contexte de limitation pollinique. Lorsque la quantité de pollen est limitante pour le succès reproducteur femelle, la sélection intrasexuelle devrait jouer sur les traits qui affectent la quantité de pollen reçu. Lorsque la quantité de pollen est non limitante pour le succès reproducteur femelle, la sélection intersexuelle devrait impacter les traits qui ont un lien avec la qualité du pollen reçu (Aizen et Harder, 2007).

Par exemple, il a été avancé que la longueur du style était sous sélection intersexuelle chez les espèces allofécondantes[7] (Ramesha et al., 2011). Ainsi, la longueur du style est plus grande chez ces espèces, par rapport aux espèces autofécondantes[8]. Chez ces dernières, il est supposé que les grains de pollen germant sur le stigmate représentent en moyenne une moindre diversité de donneurs de pollen, puisqu'ils peuvent provenir du même individu. Au contraire chez les espèces allofécondantes, le pollen est potentiellement plus hétérogène, et un long style pourrait résulter en une augmentation de la compétition entre ces grains de pollen permettant d'obtenir un partenaire sexuel de meilleur qualité.

Un autre mécanisme qui peut être mis en lumière est celui de la réceptivité du stigmate (Murdy et Carter, 1987). En effet, retarder le moment où le stigmate est réceptif permet d'accumuler des grains de pollen provenant de mâles différents avant que ceux-ci entrent en compétition (Douglas et Cruden, 1994). De la même manière que pour la taille du stigmate, cela permet ainsi de favoriser la diversité des potentiels partenaires sexuels. Les grains de pollen germent alors de manière simultanée, favorisant ainsi la compétition pollinique et augmentant potentiellement la diversité génétique et/ou la qualité des descendants (Pannell et Labouche, 2013). Egalement, la germination des grains de pollen peut être retardée tant que le stigmate n'a pas reçu un nombre suffisant de grains de pollen (Ganeshaiah et Uma Shaanker, 1988). En effet, le grain de pollen a besoin d'eau et d'un pH approprié pour entamer sa germination. Ces conditions peuvent en partie être contrôlées par l'organe sexuel femelle. Par exemple, chez *Leucadendron* sp., si le nombre de grains de pollen sur le stigmate est inférieur à un seuil critique, le pH du fluide stigmatique reste à 5 et le stigmate reste non-réceptif : la germination est alors impossible. Quand le nombre de grains de pollen excède ce seuil critique, le pH augmente, ce qui va désactiver l'inhibition et donc permettre la germination des tubes polliniques. Ce mécanisme augmente également le nombre de pères potentiels et donc la compétition pollinique (Ganeshaiah et Uma Shaanker, 1988).

Post-fécondation

Il est plus difficile d'inscrire les mécanismes d'avortements directement dans le cadre de la sélection sexuelle, bien que les preuves empiriques d'un choix non-aléatoire chez les plantes soit nombreuses (révisé par Marshall, 1991). En effet, et pour les mêmes raisons que

[7] Fécondation uniquement possible avec d'autres individus, on parle d'auto-incompatibilité.
[8] Fécondation possible avec soi-même, on parle d'auto-compatibilité.

pour les animaux, on peut voir cette sélection comme fonction de la qualité du père (choix du partenaire sexuel), mais également directement fonction de la qualité du descendant, si son développement s'est mal déroulé (pour favoriser les autres descendants si les ressources sont limitées). Dans ce dernier cas, on entre alors plutôt dans le cadre de la sélection de fécondité. Néanmoins, certains auteurs avancent que ces avortements préférentiels de graines ou fruits pourraient avoir évolué sous l'action d'une sélection intersexuelle (Kaul et Raina, 2020; Christopher et al., 2020).

2.2.3 Des traits floraux et des pollinisateurs

L'évolution des traits floraux a été façonnée par le biais de facteurs multiples (Strauss et Whittall, 2006), mais les études tendent à montrer que les pollinisateurs ont joué un grand rôle dans l'évolution d'une telle diversité chez les angiospermes (Caruso et al., 2019). Ces pollinisateurs sont très diversifiés, mais comprennent en grande majorité des insectes (environ 350000 espèces, avec les Lépidoptères, Coléoptères, Hyménoptères et Diptères en taxons principaux), mais également des oiseaux (1089 espèces décrites) et des mammifères (344 espèces ; Ollerton, 2017).

La sélection médiée par les pollinisateurs agit ainsi sur les traits floraux qui ont un rôle dans l'export (mâle) ou l'import (femelle) de pollen. Ce type de sélection devrait donc en partie se recouper avec la sélection sexuelle pré-pollinisation, même si nous avons vu qu'il existe des formes d'adaptations qui n'impliquent pas les pollinisateurs (p. ex. la protandrie). Néanmoins, il faut noter que tous les auteurs ne sont pas explicites sur ce dernier point. Dans cette section, les différents traits pouvant être sous sélection médiée par les pollinisateurs seront donc passés en revue, sans que l'on ne sache a priori à quel point il s'agit de sélection sexuelle. Nous nous attacherons par la suite à discuter les liens entre ces différents types de sélection (voir section 3.3). Deux mécanismes sont associés à la sélection médiée par les pollinisateurs : (i) l'attraction des pollinisateurs, qui va jouer sur le nombre de pollinisateurs et/ou le temps passé par fleur et par individu, et (ii) l'ajustement entre les parties reproductives de la fleur et le corps du pollinisateur.

2.2.3.1 Mécanismes impliqués dans l'interaction traits floraux-pollinisateurs

Attraction

Différents types de traits sont impliqués dans l'attraction des pollinisateurs, et il est possible de les classifier selon trois catégories : (i) les signaux visuels, (ii) les signaux olfactifs et (iii) les ressources florales.

Parmi les signaux visuels, on retrouve les traits impliqués dans le floral display, c'est-à-dire le nombre et la taille des fleurs. De nombreuses études ont ainsi montré qu'un individu qui présente plus de fleurs sera plus visité par les pollinisateurs que les conspécifiques moins voyants (p. ex. Klinkhamer et de Jong, 1990; Conner et Rush, 1996; Bond et Maze, 1999; Chittka et Thomson, 2001). La même réponse des pollinisateurs a été observée en ce qui

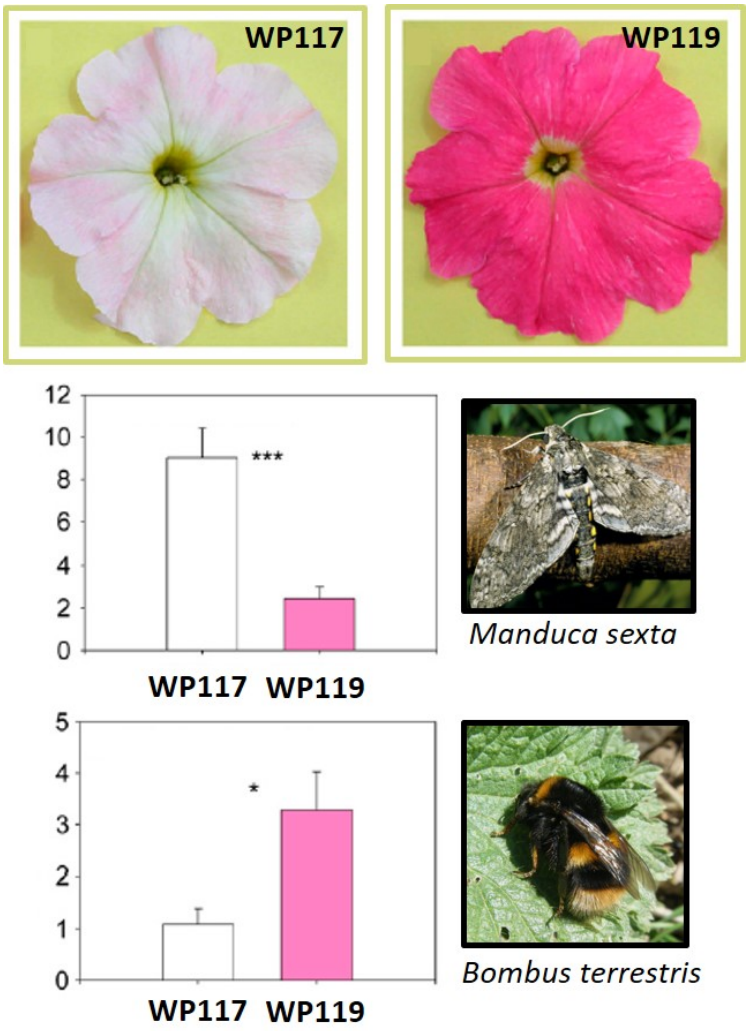


Figure 7: Résultats obtenus par Hoballah et al. (2007) chez *Petunia* sp. Les morphes WP117 et WP119 correspondent respectivement aux morphes blancs et roses. Les graphes montrent le nombre de visites moyen (± erreur-standard) par session d'observations de cinq minutes, pour le sphynx *Manduca sexta* (haut) et pour *Bombus terrestris* (bas), selon le morphe. Adapté de Hoballah et al. (2007), photos issues de Google Image.

concerne la taille des fleurs (p. ex. Stanton et al., 1991; Ashman et Stanton, 1991; Conner et Rush, 1996). Egalement, la couleur des fleurs peut influencer l'attraction des pollinisateurs selon leur système visuel (Briscoe et Chittka, 2001; Gegear et Burns, 2007). Par exemple, la variation des couleurs de pétales chez *Petunia* sp. est majoritairement déterminée par un facteur de transcription, AN2. A l'aide d'outils transgéniques, les auteurs ont ainsi montré que *Manduca sexta*, un lépidoptère, visite préférentiellement les morphes blancs de *Petunia sp.* tandis que *Bombus terrestris*, un hyménoptère, visite préférentiellement les morphes roses (Figure 7 ; Hoballah et al., 2007).

Parmi les signaux olfactifs, il existe une grande variété de Composés Organiques Volatiles (COV) qui sont impliqués dans l'attraction des pollinisateurs (Huber et al., 2005; Schiestl, 2010). Le bouquet floral émis par les fleurs est souvent complexe, composé de plusieurs molécules émises conjointement. L'identité des COV émis, ainsi que leurs proportions rela-

tives, peuvent jouer un rôle dans l'attraction des pollinisateurs (Delle-Vedove et al., 2017). De la même façon que pour les variations de couleurs, dont la perception varie entre taxons de pollinisateurs, la perception des odeurs varie entre espèces de pollinisateurs. Certains de ces composés sont par ailleurs corrélés avec la présence de récompense comme le nectar, et pourraient donc être des indices utilisés par les pollinisateurs (Raguso, 2008).

Enfin, les pollinisateurs peuvent aussi répondre à une variation dans la quantité et/ou qualité de ressources florales disponibles. Ces ressources sont principalement le pollen (source de lipides et protéines) et le nectar (majoritairement source de glucose, fructose et sucrose ; Nicolson, 2011) selon le régime alimentaire du pollinisateur. Ainsi les individus qui offrent plus de nectar et/ou du nectar plus concentré peuvent être plus visités (Pleasants, 1981; Hodges, 1995). D'autres études ont également montré que les pollinisateurs se nourrissant de pollen pouvaient montrer des préférences selon la quantité de pollen contenu dans les fleurs, mais qu'ils répondaient en premier lieu à d'autres indices (Robertson et al., 1999; Carr et al., 2015).

Ajustement

Certains traits ont également pu évoluer, indépendamment de l'attractivité, du fait de leur impact sur l'ajustement entre les structures florales et le pollinisateur. Ainsi, l'exemple phare de ce mécanisme d'ajustement est la co-évolution entre l'éperon des orchidées et le proboscis de leurs pollinisateurs (Darwin, 1862; Whittall et Hodges, 2007). Plus le calice est profond, plus le pollinisateur doit se rapprocher des structures reproductives pour pouvoir puiser le nectar au fond du calice, plus la quantité de pollen prélevé et/ou déposé est importante. Du côté de la fonction femelle, le style peut également avoir évolué de manière à optimiser l'ajustement entre le corps du pollinisateur et le stigmate (Dai et Galloway, 2011). Chez les plantes hermaphrodites, une stratégie avantageuse est de posséder différents morphes floraux au sein d'une même espèce (Figure 8). Cela peut ainsi permettre de limiter l'interférence sexuelle[9], lorsque les stigmates et les anthères ne sont pas au même niveau sur la fleur. Le transfert peut également être plus efficace, lorsque le stigmate se trouve à hauteur du pollen sur le corps du pollinisateur (Barrett, 2002). Il a ainsi été montré chez *Passiflora incarnate* que plus le style était déployé, plus la femelle recevait de grains de pollen du fait de l'importance de la surface de contact avec le pollinisateur (Dai et Galloway, 2013).

2.2.3.2 Sélection sexe-spécifique sur les traits floraux

Nous avons vu précédemment que certains traits floraux affectaient (i) l'attraction des pollinisateurs et/ou (ii) le nombre de grains de pollen qu'ils prélèvent ou déposent par l'ajustement des organes sexuels avec leur corps. Néanmoins, le nombre de visites par les pollinisateurs ou la quantité de pollen transportée ne constitue pas des estimateurs satisfaisants du succès reproducteur pour estimer la sélection sur ces traits (voir section 3.1). En effet, le pollen

[9]Lorsque les organes sexuels mâle et femelle sont situés au même niveau sur la fleur, à la fois le pollen sur le corps du pollinisateur peut ne pas être déposé de manière optimale sur le stigmate à cause de l'interférence des anthères, et le pollen présent dans les anthères peut ne pas être prélevé correctement à cause de l'interférence des stigmates.

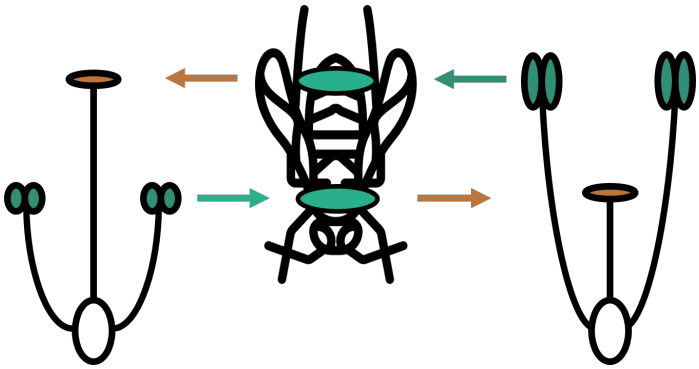


Figure 8: Représentation de deux morphes floraux (c-à-d distylie), qui divergent dans l'arrangement des structures florales, avec en vert les anthères et en orange les stigmates. Les flèches vertes représentent le prélèvement du pollen sur le corps du pollinisateur, les flèches oranges le dépôt du pollen sur le stigmate. Adapté de Barrett (2002).

prélevé par un pollinisateur ne fécondera pas forcément un ovule : il existe une multitude de voies par lesquelles le pollen peut être perdu au cours des visites (révisées par Minnaar et al., 2019). Bien que certaines études aient montré qu'une plus grande attractivité et donc un plus grand export de pollen pour les mâles se traduisait par un plus grand succès reproducteur (p. ex. Stanton et al., 1986), il convient de mesurer directement le succès reproducteur via les deux sexes ou fonctions sexuelles pour étudier la sélection sexe-spécifique sur les traits floraux. A noter que ces traits floraux ne pourront avoir une réponse évolutive que s'ils sont héritables, ce qui semblent être le cas au moins pour la taille de corolle, le nombre de fleurs et la quantité de nectar (Ashman et Majetic, 2006).

Tableau 1: Résumé des résultats des études ayant mesuré les gradients de sélection sexe-spécifique sur les traits floraux chez des espèces entomogames.

Espèce	Durée de vie (durée de l'étude)	Système de reproduction	SR femelle	SR mâle	Trait	Sens	Comparaison	Référence
Asclepias exaltata	Pérenne (une saison de floraison)	Hermaphrodite (SI)	Nombre de graines	Catégorielle	Nombre de fleurs	M : (+) F : (+)	F >M	Broyles et Wyatt (1990)[1]
Brassica rapa	Annuelle (saison de floraison entière)	Hermaphrodite (SI)	Masse des graines produites	Catégorielle	Début de floraison[2]	M (-) F (-)	NA	Austen et Weis (2015, 2016)
Clarkia xantiana	Annuelle (une semaine)	Hermaphrodite (SC)	Taux de mise à graines : (i) en ne considérant que l'allofécondation (ii) en considérant auto- et allofécondation	Catégorielle	Surface pétale	M (+) F (+) pour les deux estimateurs	M >F	Briscoe Runquist et al. (2017)
Mimulus guttatus	Annuelle ou pérenne (saison de floraison entière)	Hermaphrodite (SC)	Nombre de graines (estimé à partir du poids et régression étalon)	Fractionnelle	Largeur de corolle	M : (0) F : (+)	F >M	van Kleunen et Ritland (2004)
Narcissus triandrus	Biannuelle ou pérenne (pic de floraison)	Hermaphrodite (SI tardif)	Nombre total de graines produites	Fractionnelle	Nombre de fleurs	M : (- ou 0) F : (0 ou +)	F >M	Hodgins et Barrett (2008)
					Largeur de corolle	M : stabilisante F : (0)	M >F	
					Hauteur de calice	M : stabilisante F : (0)	M >F	
Raphanus sativus	Annuelle ou biannuelle (une saison de floraison)	Hermaphrodite (SC)	Nombre de graines[3]	Fractionnelle	Nombre de fleurs	M : (+) puis saturation F : (+)	NA	Devlin et Ellstrand (1990)[4]
					Couleur	M : moins pigmenté F : (0)	M >F	
Raphanus raphanistrum	Annuelle (saison de floraison entière)	Hermaphrodite (SC)	Nombre de graines viables	Catégorielle[5]	Nombre de fleurs	M : (+) F : (+)	NA	Conner et al. (1996a,b)
Raphanus raphanistrum	Annuelle (une semaine)	Hermaphrodite (SC)	Nombre de graines	Fractionnelle	Nombre de fleurs	M : (+) F : (+)	F >M[6]	Sahli et Conner (2011)
					Taille de fleurs[7]	M : (+) F : (0)	M >F	
Polemonium brandegeei[8]	Pérenne (48h)	Hermaphrodite (SI)	Nombre de graines produites	Catégorielle	Quantité de sucre par fleur	M : (+) F : (0)	M >F	Kulbaba et Worley (2012)
					Hauteur de calice	M : (+) F : (0)	M >F	
					Herkogamie	M : (0) F : (-)	F >M	
Solanum carolinense	Pérenne (une saison de floraison)	Andromonoïque (SI)	Nombre de graines	Fractionnelle	Proportion de fleurs qui expriment la fonction mâle	M : (+) F : NA	NA	Elle (1999); Elle et Meagher (2000)
					Nombre total de fleur	M : (0) F : (+)	F >M	
					Taille de fleurs	M : inconsistant F : (0)	NA	
Silene latifolia	Perenne (saison de floraison entière)	Dioïque	Nombre de graines	Fractionnelle	Hauteur de calice	M : sélection stabilisante F : inconsistant	NA	Wright et Meagher (2003)

Description : La durée de vie de l'espèce est indiquée, avec entre parenthèse la fenêtre temporelle sur laquelle ont été estimé les succès reproducteurs. Pour le système de reproduction, SC = auto-compatible et SI = auto-incompatible. La manière dont a été estimé le succès reproducteur (SR) femelle est indiqué. La méthode d'analyse de paternité utilisée pour le SR mâle est indiquée : catégorielle ou fractionnelle (voir section mesurer la sélection). Le sens de la sélection sur le trait étudié est indiqué, avec (+) sélection positive, (-) sélection négative et (0) absence de sélection. Lorsque l'information était disponible, le résultat de la comparaison statistique de la force de la sélection chez les mâles et les femelles est indiqué dans la colonne « Comparaison » (NA quand ce test n'a pas été conduit).

[1] Estimation avec différentiel de sélection sur succès reproducteur absolu.

[2] Pour les mâles, estimé par l'âge au début de floraison ; pour les femelles par la date au début de floraison. Les deux sont corrélés positivement.

[3] Estimation avec échantillonnage de fruits et comptage des graines, puis multiplication de la moyenne obtenue sur l'échantillon par le nombre de fruits.

[4] Analyses refaites avec analyse de paternité catégorielle par Morgan et Conner (2001), résultats qualitativement similaires.

[5] Estimation avec échantillonnage de fruits et comptage des graines, puis multiplication de la moyenne obtenue sur l'échantillon par le nombre de fruits.

[6] Présence de limitation pollinique, la seule étude où elle a été quantifiée.

[7] Mesuré avec ACP sur une suite de six traits floraux. Résultats dans une population expérimentale pollinisée par Bombus uniquement.

[8] Pollinisation par des sphynx dans cette étude uniquement, mais est également pollinisée par des colibris *in natura*.

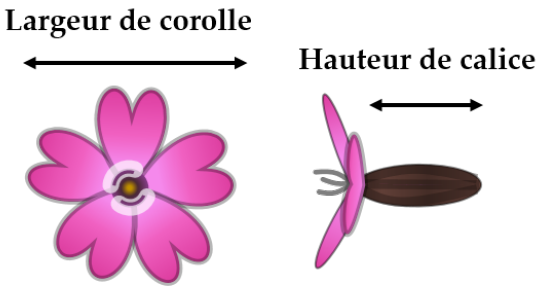


Figure 9: Noms utilisés pour désigner les structures florales.

Dans le Tableau 1, les résultats de diverses études portant sur des espèces entomophiles et qui se sont intéressées aux effets des traits floraux en termes de succès reproducteur chez les deux fonctions sexuelles ou sexes sont reportés (à l'aide de gradients de sélection, voir mesurer la sélection). Ces études ont principalement porté sur des organismes hermaphrodites. Le vocabulaire pour désigner les différentes mesures étant rarement le même selon l'espèce étudiée, les noms ont été homogénéisés Figure 9. On remarque ainsi que les traits floraux semblent être plus souvent sous sélection plus forte par la voie mâle, hormis très notablement le nombre de fleurs qui est exclusivement sous sélection plus forte par la voie femelle (Tableau 1).

Dans ce contexte et concernant le nombre de fleurs, l'hypothèse de la fonction mâle (*male-function hypothesis*) stipule pourtant que ce trait devrait avoir évolué parce qu'il permet d'augmenter le succès reproducteur par le biais de la fonction mâle chez les organismes hermaphrodites (Queller, 1983; Burd et Callahan, 2000). En effet, les espèces hermaphrodites produisent souvent plus de fleurs que ce qui va finalement donner des fruits (c-à-d un taux de fructification sub-optimal ; Sutherland, 1985). Cet excès de fleurs pourrait donc avoir un rôle dans l'attraction des pollinisateurs et donc l'export de pollen uniquement. Néanmoins, les preuves empiriques qui corroborent cette hypothèse à l'aide de mesure directe de la sélection semblent bien inexistantes.

2.2.3.3 Dimorphisme sur les traits floraux chez les espèces dioïques

Les études qui se sont intéressées à mesurer la sélection sexe-spécifique sur les traits floraux portaient principalement sur des espèces hermaphrodites (Tableau 1). Chez les espèces dioïques où l'évolution des traits sous sélection sexe-spécifique est moins contrainte par des associations génétiques, des pressions de sélection différentielles entre les sexes sur les traits floraux pourraient ainsi conduire à l'évolution d'un dimorphisme sexuel. En effet, chez ces espèces, un dimorphisme sexuel pour les traits impliqués dans l'attraction des pollinisateurs est souvent reporté (Tableau 2 ; Barrett et Hough, 2012).

Si l'attraction des pollinisateurs augmente l'accès aux gamètes du sexe opposé, ce dimorphisme pourrait avoir évolué par le biais d'une sélection sexuelle différentielle entre les sexes (Moore et Pannell, 2011). Pour la plupart des traits floraux classiquement étudiés, le dimorphisme est biaisé vers les mâles, c'est-à-dire que ceux-ci présentent des phénotypes plus

Tableau 2: Résumé des études décrivant le dimorphisme sexuel sur des traits attractifs chez des espèces dioïques zoogames.

Trait floral	Nombre d'espèces (et de familles)	Dimorphisme M > F F > M F = M	Références
Nombre de fleurs	20 espèces (7 familles)		Eckhart (1999); Cuevas et al. (2017); Moquet et al. (2020)
Taille de fleurs (zones tempérées)	75 espèces[1]		Delph (1996); Delph et al. (1996); Tsuji et al. (2020)
Taille de fleurs (zones tropicales)	299 espèces[1]		Delph (1996); Delph et al. (1996); Cuevas et al. (2017)
Volume de nectar par fleur	19 espèces (12 familles)		Eckhart (1999); Tsuji et al. (2020)
Concentration en sucre du nectar par fleur	4 espèces (3 familles)		Kay et al. (1984); Gehring et al. (2004); Draper et al. (2020); Tsuji et al. (2020)
Emission totale de COV	15 espèces (7 familles)		Ashman (2009)
Composition globale de COV[2]	38 espèces (11 familles)	Oui : 52.6% Non : 43.4%	Ashman (2009); Okamoto et al. (2013)

[1] 104 familles au total. Les études de Delph (1996) et Delph et al. (1996) comprennent également les résultats du dimorphisme sur des espèces monoïques à fleurs de sexe différent (information non présentée).
[2] Présence de dimorphisme ou non sur la composition globale de COV grâce à des indices de divergence entre sexe.

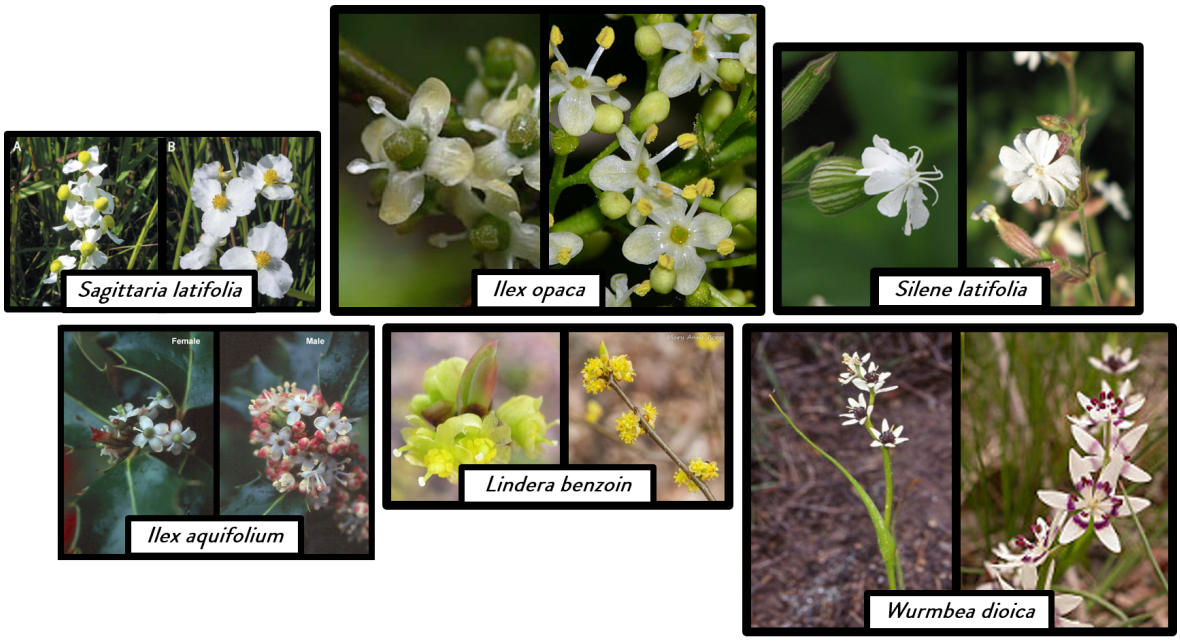


Figure 10: Exemples de dimorphisme sexuel pour le nombre et/ou la taille des fleurs chez des plantes dioïques zoogames. La femelle est située à gauche, le mâle est situé à droite. Photos issues de Google Image.

extrêmes que les femelles (Tableau 2 ; Figure 10). Les seules exceptions sont (i) le volume de nectar (pour ce trait, le dimorphisme est aussi fréquent dans un sens que dans l'autre Eckhart, 1999; Tsuji et al., 2020) et (ii) le nombre de fleurs. Pour ce dernier trait, le sens du dimorphisme dépend de la zone d'étude : en zone tropicale on retrouve autant d'espèces où le dimorphisme est biaisé vers les femelles que l'inverse, alors qu'en zone tempérée on retrouve largement le patron classique d'un biais vers les mâles (Delph, 1996; Delph et al., 1996). Peu de données sont disponibles pour la concentration en nectar par fleur, mais elles semblent tout de même aller dans le sens où les mâles sont plus attractifs (Kay et al., 1984; Gehring et al., 2004; Draper et al., 2020; Tsuji et al., 2020). Ce dimorphisme sexuel reporté chez les espèces dioïques semblent donc bien aller dans le sens d'une sélection intrasexuelle pour l'accès aux pollinisateurs plus forte pour les mâles (Moore et Pannell, 2011). Néanmoins, il est à noter que la présence de limitation pollinique peut induire une sélection intrasexuelle forte chez les femelles également. Dans l'hypothèse où les mêmes traits sont liés à l'accès aux gamètes du sexe opposé pour les deux sexes, le dimorphisme sexuel peut alors être réduit. Il serait ainsi intéressant de comparer le degré de limitation pollinique entre les zones tempérées et tropicales, afin d'étudier si il existe une corrélation entre le dimorphisme sur le nombre de fleurs et ce degré de limitation pollinique.

2.2.3.4 Contexte écologique et limitation pollinique

Le contexte écologique va également moduler l'intensité de la sélection intrasexuelle pré-pollinisation, de la même manière que pour les animaux (voir contextualiser la sélection sexuelle). Ainsi, les caractéristiques de la population (p. ex. sexe-ratio et densité) vont

régir la quantité de gamètes mise à disposition pour la reproduction (Ashman et Diefenderfer, 2001; Kokko et Rankin, 2006). Au-delà des caractéristiques des populations de plantes, l'abondance et la composition des communautés de pollinisateurs pour les espèces zoogames vont également moduler la quantité de gamètes disponibles pour la reproduction (Ashman et al., 2020). Les variations spatio-temporelles des communautés de pollinisateurs sont alors à considérer pour contextualiser le cadre dans lequel la sélection sexuelle va agir. Ainsi, Dai et Galloway (2013) ont estimé la force globale de la sélection par la voie femelle chez une espèce hermaphrodite, *Passiflora incarnata*, à l'aide du gradient de Bateman et en manipulant le contexte de pollinisation. Les auteurs ont observé que la sélection sexuelle était absente par la fonction femelle en absence de limitation pollinique, alors que le gradient de Bateman devenait positif lorsque la limitation pollinique était exacerbée, suggérant un plus fort potentiel pour la sélection sexuelle d'agir sur les traits floraux.

Les mesures de limitation pollinique permettent ainsi d'estimer si les services polliniques sont optimaux (c-à-d s'ils permettent d'atteindre une production de graines maximale), et de nombreuses études appuient une prépondérance des cas de limitation pollinique *in natura* (Burd, 1994; Ashman et Morgan, 2004; Knight et al., 2005). Pour mesurer la limitation pollinique, des méthodes de supplémentation sont utilisées : en saturant la surface des stigmates en pollen, et en comparant le nombre de graines produites par ces fleurs par rapport à des fleurs pollinisées naturellement, on peut savoir si la quantité de pollen déposée par les pollinisateurs est suffisante pour fertiliser tous les ovules (Ashman et Morgan, 2004). Ce type de test peut se conduire de deux manières : (i) en apparié, en appliquant les deux traitements au sein d'un même individu (c-à-d des fleurs supplémentées et des fleurs pollinisées naturellement) ou (ii) à l'échelle de l'individu, en ayant un groupe de plantes dont les fleurs sont toutes supplémentées et un groupe de plantes dont les fleurs sont toutes pollinisées naturellement. Néanmoins, les tests en apparié ont montré que la réallocation de ressources (p. ex. allocation moindre aux fleurs ayant reçu moins de pollen) pouvait conduire à une surestimation de la limitation pollinique. En ce sens, les tests à l'échelle de l'individu sont préconisés pour ne pas biaiser l'estimation du niveau de limitation pollinique (Knight et al., 2006). Par ailleurs, les méthodes classiques de supplémentation ne s'intéressent généralement pas à l'effet de la diversité des grains de pollen déposés pour saturer le stigmate (c-à-d effet de la quantité sans la qualité ; Aizen et Harder, 2007).

3. Etudier la sélection sexuelle

Dans les sections précédentes, nous avons vu comment la théorie de la sélection sexuelle avait émergé à travers le prisme des modèles animaux. Nous avons ensuite caractérisé les subtilités lors de l'application de cette théorie à des organismes avec un mode de reproduction différent. Dans cette partie, nous allons nous focaliser sur la méthodologie permettant d'estimer la sélection sexuelle.

3.1 Mesurer la sélection naturelle

Comprendre comment la sélection naturelle opère un tri sur la variation phénotypique nécessite dans un premier temps d'estimer les conséquences des traits phénotypiques en termes de valeur sélective. Nous avons pu voir dans la première partie que cette valeur sélective pouvait être approximée à l'échelle individuelle à l'aide du succès reproducteur (à vie). Le succès reproducteur est donc le nombre de descendants laissés à la génération suivante. Chez les plantes, le succès reproducteur femelle peut ainsi être estimé par le nombre de graines produites sur l'ensemble des saisons de reproduction dans le cas des espèces pérennes. Il suffit alors de récolter les fruits à maturité et de compter leur contenu en graines. Une mesure plus fine de ce succès reproducteur inclut souvent une estimation du taux de germination des graines : en effet seules les graines qui ont effectivement germé pourront potentiellement contribuer à leur tour à la génération suivante. En ce qui concerne le succès reproducteur mâle, le seul moyen d'estimer le nombre de descendants laissés à la génération suivante est de procéder à des analyses de paternité (Bernasconi, 2003). Pour ce faire, un sous-échantillon (pour des raisons techniques et économiques) de graines produites est génotypé à l'aide de marqueurs génétiques polymorphes. L'identité de la mère est (le plus souvent) connu, et l'ensemble des individus reproducteurs de la population ont également été génotypés pour ces marqueurs génétiques neutres. En se basant sur les règles de transmission mendélienne (même probabilité de transmission d'un allèle ou l'autre à la descendance) et sur les fréquences alléliques dans la population, il est ainsi possible d'assigner chaque paternité par maximum de vraisemblance (c-à-d analyse catégorielle ; Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007) ou d'assigner une probabilité à chacun des mâles d'être le père d'un descendant (analyse fractionnelle ; Devlin et al., 1988; Jones et Ardren, 2003). Avec cette dernière méthode d'analyse, il devient possible d'estimer conjointement le kernel de dispersion de pollen (c-à-d la probabilité de fécondation en fonction de la distance de dispersion) et les succès reproducteurs individuels mâles ; on parle de *neighbordhood model*.

Une fois les succès reproducteurs des deux sexes estimés, il est ainsi possible d'estimer la sélection sexe-spécifique sur les traits des deux sexes. Tandis que l'évolution des traits est dépendante de leur héritabilité, la sélection agit directement sur les phénotypes indépendamment de leur base génétique. C'est à partir de ce constat que Lande et Arnold (1983) proposèrent une méthode afin d'estimer la sélection naturelle sur des traits corrélés. Cette méthode repose ainsi sur des régressions multiples entre les traits Z et les succès reproducteurs relatifs (par rapport au succès reproducteur moyen de la population étudiée) w :

$$w = a + \sum_{i}^{n} \beta_i Z_i + \frac{1}{2} \sum_{i}^{n} \gamma_i Z_i^2 + \sum_{i}^{n} \sum_{j}^{n} \gamma_{ij} Z_i Z_j + e$$

Avec a l'intercept et e l'erreur résiduelle. Le premier terme avec β_i donne ainsi la sélection directionnelle sur le trait Z_i, le second terme avec γ_i donne la sélection quadratique (c-à-d stabilisante ou disruptive) sur le trait Z_i – en corrigeant par 1/2 (Stinchcombe et al., 2008) – et le dernier terme avec γ_{ij} terme donne la sélection corrélative entre deux traits Z_i et Z_j. Le gradient de sélection β donne ainsi une estimation de la sélection directionnelle sur les

traits, tout en prenant en compte les corrélations entre traits. Il s'agit d'une estimation de la sélection directe sur les traits (c-à-d leur effet direct en termes de succès reproducteur), contrairement au différentiel de sélection s (Henshaw et al., 2018). Ce dernier est estimé à l'aide de régression simple du succès reproducteur contre les traits séparés, et donne une estimation de la sélection totale sur les traits : un trait peut-être sous sélection parce qu'il est corrélé à un autre trait, sans avoir d'effet direct sur le succès reproducteur (c-à-d une sélection indirecte). Afin de comparer la force de la sélection sur les différents traits, il convient également de standardiser les traits afin de s'affranchir de leur unité de mesure (p. ex. *variance(SD)-standardization*, *mean-standardization* ; Matsumura et al., 2012). Ainsi, la méthode proposée par Lande apporte un outil simple et efficace pour mesurer les gradients de sélection bien que, comme toute approche corrélative, elle n'infère pas de relation de causalité.

3.2 Gradients de sélection sexuelle

La sélection sexuelle agissant sur les traits peut être estimée de la même manière que la sélection naturelle, c'est-à-dire en travaillant avec des régressions multiples (Henshaw et al., 2018). Néanmoins, le succès reproducteur n'est alors plus la variable réponse. On travaille dorénavant sur un estimateur de l'accès à la reproduction, le *mating success* (voir section 3.3). On estime alors des gradients de sélection sexuelle β_{SS}, qui vont nous indiquer la force et la direction de la sélection sexuelle sur ce trait. Ainsi, en comparant les gradients de sélection β et les gradients de sélection sexuelle β_{SS}, on peut déduire si un trait sous sélection sexuelle est également sous sélection naturelle. L'harmonie entre la sélection sexuelle et la sélection naturelle va dépendre des effets du trait sous sélection sexuelle en termes de survie et de fécondité (Figure 2).

3.3 Comment définir le *mating success*

Alors que la définition du succès reproducteur fait consensus[10], définir le *mating success* est plus ardu. Jusqu'ici, le parti a été pris de ne pas en donner une définition précise : nous avons parlé de succès d'accouplement en début d'introduction chez les animaux à fécondation interne, en tant qu'accès aux partenaires sexuels et/ou aux gamètes du sexe opposé. Chez les animaux à fécondation externe, nous avons parlé de succès de fertilisation. Chez les plantes, nous avons parlé de nombre de visites par les pollinisateurs, mais aussi d'export (mâle) ou import (femelle) de pollen. En somme, il semblerait que cette notion du *mating success* va dépendre du système de reproduction de l'organisme étudié mais aussi de l'échelle d'observation à laquelle on se place (Figure 11). Selon la définition donnée au *mating success* et donc la méthode d'estimation utilisée, le processus caractérisé dans la chaîne de reproduction (des individus aux zygotes) ne sera donc pas le même.

Dans la littérature, on retrouve plusieurs définitions du *mating success*, particulièrement lorsqu'on ouvre le champ des organismes d'études au-delà des animaux. Ainsi, lorsque le

[10] Avec néanmoins certaines subtilités quand à inclure ou non des estimateurs du succès reproducteur des descendants (p. ex. le poids des graines) ce qui peut conduire à une sous-estimation de la sélection directe sur les traits maternels (Wolf et Wade, 2001).

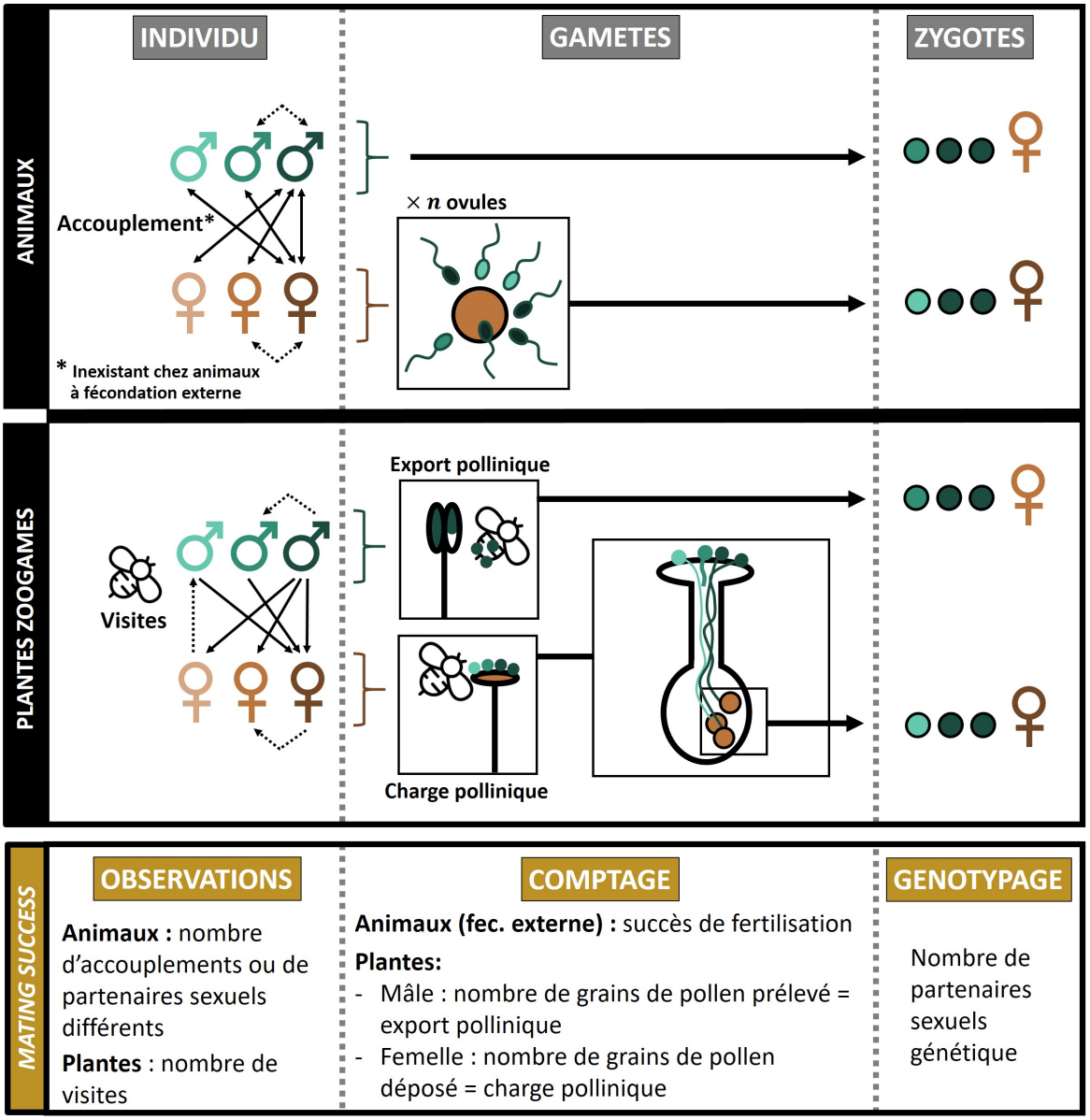


Figure 11: Schéma des différentes méthodes d'estimation du *mating success*, selon l'organisme d'étude (animaux versus plantes zoogames) et l'échelle d'observation (individu, gamètes ou zygotes) au cours de la chaîne de reproduction. A gauche, les flèches pleines représentent les accouplements ou visites efficaces (c-à-d avec un transfert de gamètes mâles vers l'organe sexuel femelle), tandis que les flèches pointillées représentent des transferts inefficaces. A droite, les ronds de différentes couleurs représentent les zygotes issus de différents mâles (selon la couleur) et selon la femelle.

système de reproduction permet d'observer les accouplements chez les animaux, le *mating success* peut être estimé en termes de nombre d'accouplements total d'un individu (p. ex. Moore et al., 1995) ; cependant, cette mesure est rarement utilisée. Une autre stratégie est plutôt de caractériser le nombre de partenaires sexuels différents avec lequel un individu s'accouple. Cet estimateur est appelé *copulatory mating success* (Anthes et al., 2016). Chez les plantes zoogames, les observations à l'échelle individuelle vont permettre d'estimer le nombre de visites par les pollinisateurs (qui peut par exemple être précisé en termes de pollinisateurs différents, ou de séquence de visites). Ces estimateurs basés sur les observations des individus incluent ainsi uniquement les mécanismes de sélection sexuelle pré-accouplement/pollinisation.

Chez les animaux à fécondation externe, où il n'y a pas d'accouplement, l'estimation du *mating success* va faire appel à des comptages à l'échelle gamétique : le nombre de gamètes qui ont été fertilisés (femelle) ou qui ont fertilisé (mâle) sont comptés. On parle alors de succès de fertilisation, qui diffère du nombre de zygotes produits. Pour ce dernier, les effets maternels et paternels en termes de ressources entrent en compte (Levitan, 2010). Chez les animaux à fécondation interne, ce type d'approche est plus difficilement envisageable en termes techniques. Chez les plantes zoogames (et à vecteur abiotique), ces comptages à l'échelle gamétique font appel à la charge pollinique du côté femelle (c-à-d le nombre de grains de pollen sur le stigmate) et à l'export pollinique du côté mâle (c-à-d le nombre de grains de pollen prélevé ; Delph et Ashman, 2006). L'estimation de la charge pollinique peut parfois être affinée en comptant le nombre de grains de pollen qui ont effectivement germé (partenaires viables et/ou compatibles). Ces estimateurs du *mating success* à l'échelle gamétique font alors plutôt appel à la notion de quantité de gamètes du sexe opposé à laquelle un individu a accès, sans notion de qualité.

Enfin, le *mating success* peut être estimé à partir des zygotes, en utilisant des mutants pour reconstituer les relations de paternité (comme l'avait fait Bateman ; Bateman, 1948), ou à l'aide de génotypage et d'assignation de paternité par maximum de vraisemblance Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007). On parle alors de *genetic mating success*, et cette méthode d'estimation est la méthode la plus couramment utilisée chez les animaux (Anthes et al., 2016). Le désavantage du *genetic mating success* est qu'il est souvent corrélé très positivement au succès reproducteur, comme il est estimé directement à partir des zygotes, donc à la fin de la chaîne de reproduction (Anthes et al., 2010). En ce sens, il inclut tous les mécanismes de sélection sexuelle pré- et post-accouplement/pollinisation. Des auteurs ont ainsi proposé d'estimer le *mating success* de deux manières : à l'aide d'observation d'accouplements (*copulatory mating success*) et à l'aide de génotypages (*genetic mating success*). En utilisant les deux estimateurs, il serait alors possible de distinguer les mécanismes pré-accouplement/pollinisation des mécanismes post-accouplement/pollinisation (Pélissié et al., 2014; Gauthey et al., 2017). Chez les plantes, de nouvelles techniques récemment mises au point permettraient soit d'estimer la diversité de grains de pollen présents sur les

pollinisateurs ou les stigmates (Hasegawa et al., 2015), soit de pouvoir suivre les grains de pollen à l'aide de marqueurs quantiques photo-excitables sous lumière UV (Minnaar et Anderson, 2019). De la même manière que pour les animaux, utiliser divers estimateurs pourraient permettre de discriminer les divers processus de sélection sexuelle impliqués dans la chaine de pollinisation, et quantifier les avantages à la fois (i) d'avoir accès à plus de gamètes (quantité) (ii) issus de partenaires différents (qualité).

3.4 Les métriques utilisées

Une fois le *mating success* caractérisé, il est donc possible d'estimer la sélection sexuelle (à divers niveaux donc, suivant la définition donnée au *mating success*). Cette estimation de la sélection sexuelle peut être couplée à des estimateurs de la sélection naturelle, afin de savoir si cela peut éventuellement donner lieu à une évolution du trait sous sélection sexuelle.

Tableau 3: Mesures utilisées dans la littérature pour quantifier la sélection sexuelle.

Mesure basée sur les effectifs	**Description**	**Formule**	**Références**
Sexe-ratio opérationnel OSR	Le ratio du nombre de mâles prêts à s'accoupler sur le nombre de femelles prêtes à s'accoupler, à un endroit et moment donné		Emlen et Oring (1977)
Mesures basées sur la variance			
Opportunité pour la sélection	Variance du R relatif	$\frac{\sigma_R^2}{\mu_R^2}$	Wade (1979)
Opportunité pour la sélection sexuelle	Variance du M relatif	$\frac{\sigma_M^2}{\mu_M^2}$	Wade (1979); Wade et Arnold (1980)
Indice de Morisita pour le R	Variance observée du R par rapport à la variance attendue si tous les individus sont aussi compétitifs	$N\left(\frac{\sum_i R_i^2 - \sum_i R_i}{(\sum_i R_i)^2 - \sum_i R_i}\right)$	Morisita (1962)
Indice de Morisita pour le M	Variance observée du M par rapport à la variance attendue si tous les individus sont aussi compétitifs	$N\left(\frac{\sum_i M_i^2 - \sum_i M_i}{(\sum_i M_i)^2 - \sum_i M_i}\right)$	Morisita (1962)
Indice de monopolisation pour le R	Variance observée du R par rapport à la variance maximale potentielle	$\frac{\sigma_R^2 - \mu_R}{N\mu_R^2 \mu_R}$	Ruzzante et al. (1996)
Indice de monopolisation pour le M	Variance observée du M par rapport à la variance maximale potentielle	$\frac{\sigma_M^2 - \mu_M}{N\mu_M^2 \mu_M}$	Ruzzante et al. (1996)
Gradient de Bateman[1]	Pente de la régression du R relatif sur le M relatif	$\frac{\mu_M \sigma_{R,M}}{\mu_R \sigma_M^2}$	Bateman (1948); Arnold (1994a)
Indice de Jones[2]	Force maximale de la sélection sexuelle pré-accouplement (ci-dessous)	$\beta_{SS}\sqrt{I_S}$	Jones (2009)
Mesures basées sur les traits			
Différentiel/gradient de sélection naturelle ou sexuelle directionnelle	Covariance entre les valeurs standardisées d'un (ou plusieurs) trait et son (leur) R/M relatif		Lande et Arnold (1983)
Différentiel/gradient de sélection ou sexuelle quadratique	Covariance entre les valeurs standardisées au carré d'un (ou plusieurs) trait et son (leur) R/M relatif		Lande et Arnold (1983)
Différentiel/gradient de sélection distributionnel	Changement dans la distribution d'un trait qui est lié à la sélection (directionnelle ou quadratique)		Henshaw et al. (2016)
Force de la sélection sexuelle pré-accouplement	Différentiel de sélection partiel qui est uniquement dû à la sélection sexuelle pré-accouplement	$m'\beta_{SS}$	Henshaw et al. (2016)

Notes : Le succès reproducteur absolu est symbolisé par R et le *mating success* absolu est symbolisé par M. Adapté de Klug et al. (2010); Aronsen et al. (2013); Henshaw et al. (2016, 2018).

[1] Le gradient de Bateman est ici exprimé de manière simple. Il est également possible de l'estimer de manière partielle en contrôlant pour les traits et/ou variables environnementales mesurés (Henshaw et al., 2018).

[2] *ibidem.*

Tout d'abord, il existe des estimateurs qui ne font pas appel à la notion de *mating success*. Ces estimateurs vont permettre d'estimer la force de sélection sexuelle théorique selon le contexte démographique (mesures basées sur les effectifs ; Tableau 3). Ensuite, il existe des estimateurs qui permettent de quantifier la force globale de la sélection sexuelle agissant sur les traits d'un sexe, comme les métriques dérivées du principe de Bateman énoncées en première partie (mesures basées sur la variance ; Tableau 3). Il est cependant à noter que ces métriques sont synonymes de sélection sexuelle uniquement si le lien entre le *mating success* et le succès reproducteur est causal. Il s'agit d'une hypothèse forte, néanmoins, ces métriques sont des outils efficaces puisqu'ils permettent de comparer la force maximale de la sélection sexuelle chez les deux sexes. Enfin, la sélection sexuelle peut être caractérisée selon son action sur un trait, via l'utilisation de gradients de sélection sexuelle (mesures basées sur les traits ; Tableau 3). De même, ces estimateurs sont basés sur des approches corrélatives comme évoqué précédemment, et n'impliquent pas nécessairement de lien de causalité direct. Dans le cadre de cette thèse, uniquement les indices de Bateman et les gradients de sélection sexuelle directionnels seront utilisés pour estimer la sélection sexuelle.

3.5 Mesurer expérimentalement la sélection sexuelle

Nous l'avons vu, les méthodes qui permettent d'estimer la sélection sexuelle utilisent des approches corrélatives. Cette limitation n'est pas une fatalité : les grands jeux de données qui découlent souvent des suivis *in natura* peuvent permettre de complexifier les modèles statistiques (p. ex. en prenant en compte les relations de parenté, en dissociant la part génétique de la part environnementale de la variation phénotypique) afin de mieux approcher l'essence causale des traits en termes de *mating success*. Une autre méthode efficace pour quantifier cette causalité dans la sélection sexuelle est d'avoir recours à des manipulations expérimentales du *mating success*. Chez les animaux, ces manipulations peuvent passer par une modification du nombre de partenaires sexuels en présence pour l'accouplement. Chez les plantes, les techniques de supplémentation utilisées pour estimer la sélection médiée par les pollinisateurs pourraient également faire partie de ce type de méthodes. En effet, si l'on définit le *mating success* chez les plantes, pour les femelles, comme la quantité de pollen reçu, alors comparer des femelles supplémentées (avec un *mating success* maximum donc) avec des femelles pollinisées naturellement devrait permettre d'accéder à la part de sélection sexuelle agissant sur les traits floraux. Ainsi, en comparant les gradients de sélection sur les traits floraux d'un groupe de plantes supplémentées par rapport à celle sur les traits floraux d'un groupe de plantes pollinisées naturellement, on peut discriminer la sélection sexuelle pré-pollinisation (c-à-d la sélection médiée par les pollinisateurs) des autres composantes de sélection (Figure 12 ; Sandring et Ågren, 2009; Sletvold et Ågren, 2010. Ces autres composantes de sélection devraient donc comprendre toutes les formes de sélection hors la sélection sexuelle pré-pollinisation, liée aux mécanismes d'attraction et d'ajustement des pollinisateurs avec les organes floraux. Une revue récente a ainsi montré que la force de la sélection médiée par les pollinisateurs sur les traits floraux était en moyenne environ 1.5 fois supérieure à celle de la sélection médiée par d'autres organismes (p. ex. les prédateurs

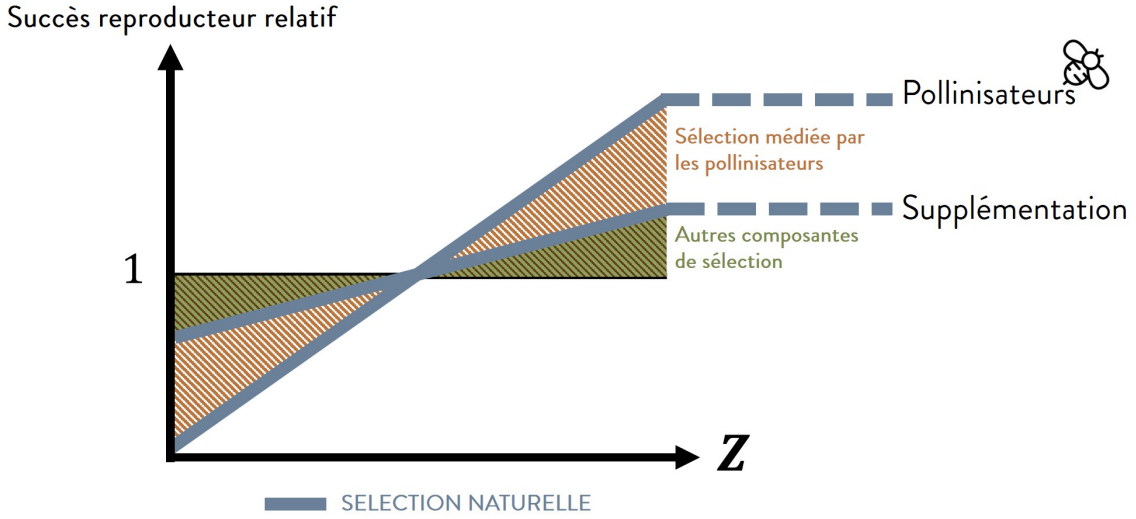


Figure 12: Schéma représentant la méthodologie pour estimer la sélection médiée par les pollinisateurs chez les femelles. Le succès reproducteur relatif est représenté en fonction d'un trait floral Z, pour les deux types de pollinisation (naturelle et supplémentation). La sélection naturelle (gradient de sélection représenté en bleu) comprend toutes les composantes de sélection (survie, fécondité, sexuelle ; Figure 2). Une partie de la sélection sexuelle, celle pré-pollinisation, devrait être théoriquement comprise dans la sélection médiée par les pollinisateurs (en orange). Les autres composantes de sélection (en vert) comprennent donc la survie (en cas de mesure du succès reproducteur à vie), la fécondité et les autres formes de sélection sexuelle (pré-pollinisation indépendante du vecteur de pollinisation et post-pollinisation). Le groupe avec supplémentation de pollen a une plus petite variance dans le succès reproducteur relatif puisque tous les individus ont accès à une grande quantité de pollen. En comparant les gradients de sélection entre le groupe pollinisé par les pollinisateurs et le groupe avec supplémentation (c-à-d différence de pente), on accède ainsi à la part de la sélection naturelle qui est médiée par les pollinisateurs.

; Caruso et al., 2019). Egalement, les études s'intéressant à l'effet des différentes espèces de pollinisateurs sur la sélection des traits floraux permettent de comprendre comment les communautés dans leur ensemble modulent ces patrons de sélection selon leur composition (Kulbaba et Worley, 2013; Wu et al., 2018). Dans le contexte de l'effet du changement global et de ses effets avérés sur le déclin des pollinisateurs et des populations de plantes en dépendant pour leur reproduction (Biesmeijer, 2006; Potts et al., 2010), ces patrons de sélection différentiels pourraient grandement impacté l'évolution des traits floraux (Thomann et al., 2013; Campbell et Powers, 2015).

L'inconvénient de cette méthode est qu'il est conceptuellement impossible d'utiliser la même approche pour étudier la sélection sexuelle par la voie mâle. En ce sens, une autre méthode pour essayer d'inférer la causalité chez les deux sexes est d'utiliser les manipulations phénotypiques (Campbell, 2009). En manipulant les traits floraux a priori impliqué dans l'attraction des pollinisateurs, et donc dans l'import/export de pollen, il devient possible de quantifier l'impact causal de ses traits en termes de sélection sexuelle pré-pollinisation. Egalement, les récents progrès techniques devraient permettre de mieux déterminer les gènes qui régulent les traits a priori sous sélection sexuelle, et donc permettre des approches de modification génétique pour inférer la causalité entre ces traits et le *mating success* (Wilkinson et al., 2015).

Au-delà des aspects de corrélation ou de causalité, la fenêtre temporelle sur laquelle est mesurée la sélection sexuelle peut également changer les patrons estimés (Hoffer et al., 2017). Chez les espèces pérennes, il y a d'évidentes difficultés logistiques à mesurer la totalité des épisodes de reproduction, et la plupart des études ne s'intéressent qu'à une saison de floraison ou à une partie de celle-ci (Tableau 1). La sélection de viabilité n'est dans ce cas pas inclue, ce qui peut amener à des erreurs de conclusion en termes de sélection sexuelle lorsque le lien entre le trait et la viabilité dépend du sexe par exemple.

Enfin, et comme déjà évoqué, le choix de l'estimateur du *mating success* conditionne également les conclusions en termes de mécanismes impliqués dans la sélection sexuelle. Chez les plantes, l'utilisation du *genetic mating success* n'a ainsi été utilisé que dans deux études publiées jusqu'à présent, chez une bryophyte (*Sphagnum macrophyllum*, Johnson et Shaw, 2016) et chez une plante dioïque anémophile (*Mercurialis annua*, Tonnabel et al., 2019b). Ces deux études reportent des résultats qui corroborent les principes de Bateman, avec les mâles sous une sélection sexuelle globale plus forte que les femelles. L'utilisation de cet estimateur qu'est le *genetic mating success* permet ainsi de conclure sur l'issue de l'ensemble des processus impliqués dans la sélection sexuelle, en termes de diversité de partenaires sexuels. Néanmoins, il comporte également des limitations autres que la circularité entre cet estimateur et le succès reproducteur, notamment lorsqu'on applique cette métrique aux plantes à fleurs, qui seront évoquées dans le chapitre I.

4. Les objectifs de cette thèse

4.1 Le modèle d'étude

Silene dioica (L) Clairv. (Caryophyllacaea) est une espèce herbacée, décrite comme une pérenne courte, bien que très peu d'informations existent sur sa durée de vie (Baker, 1947; Carlsson-Granér, 1997). Son aire de distribution s'étend sur toute l'Europe Centrale et du Nord (Baker, 1947; Jalas et Suhominen, 1986), et on la retrouve principalement en bord de forêt et prairies humides, mais également dans des habitats plus urbanisés comme les bords de route. Il s'agit d'une espèce entomophile, dont les principaux pollinisateurs sont décrits comme appartenant au genre *Bombus* et à la famille des Syrphidae (Baker, 1947; Westerbergh et Saura, 1994; Jürgens et al., 1996), mais également quelques pollinisateurs de nuit appartenant à la famille des Noctuidae ont été décrits comme impliqués dans sa reproduction (Jürgens et al., 1996). Enfin, *Silene dioica* est une espèce dioïque, avec une détermination chromosomique du sexe (Warmke, 1946; Ming et al., 2011), et elle présente un dimorphisme pour de nombreux traits impliqués dans la reproduction (Tableau 4 ; Figure 13).

Pourquoi cet organisme ? La présence d'un tel dimorphisme avec les mâles plus attractifs pouvait donc amener à penser que la sélection agissant sur les traits floraux liés à l'accès aux pollinisateurs est plus forte chez les mâles (Tableau 4 ; Figure 13). Par ailleurs, le

Figure 13: Illustration du dimorphisme sexuel chez *Silene dioica*, pour le nombre et la taille des fleurs. Les mâles (bas) ont plus de fleurs, de plus large corolle et un calice plus haut que les femelles (haut). Crédit photos : I. De Cauwer, P. Goujon & M. Vanderplanck.

Tableau 4: Dimorphisme pour les traits floraux chez *Silene dioica*.

Trait	Dimorphisme	Références
Nombre de fleur journalier	M > F	Kay et al. (1984); Moquet et al. (2020)
Production totale de fleurs	M > F	Moquet et al. (2020)
Taille de corolle	M > F	Kay et al. (1984); Baena-Díaz et al. (2019); Moquet et al. (2020)
Hauteur du calice	M > F	Kay et al. (1984); Baena-Díaz et al. (2019); Moquet et al. (2020)
Longueur de pétale	M > F	Baena-Díaz et al. (2019); Moquet et al. (2020)
Largeur de pétale	M > F	Moquet et al. (2020)
Volume de nectar par fleur	F > M	Kay et al. (1984); Hemborg (1998)
Concentration en sucre du nectar par fleur	M > F	Kay et al. (1984)
Durée de floraison	M > F	Hemborg (1998)

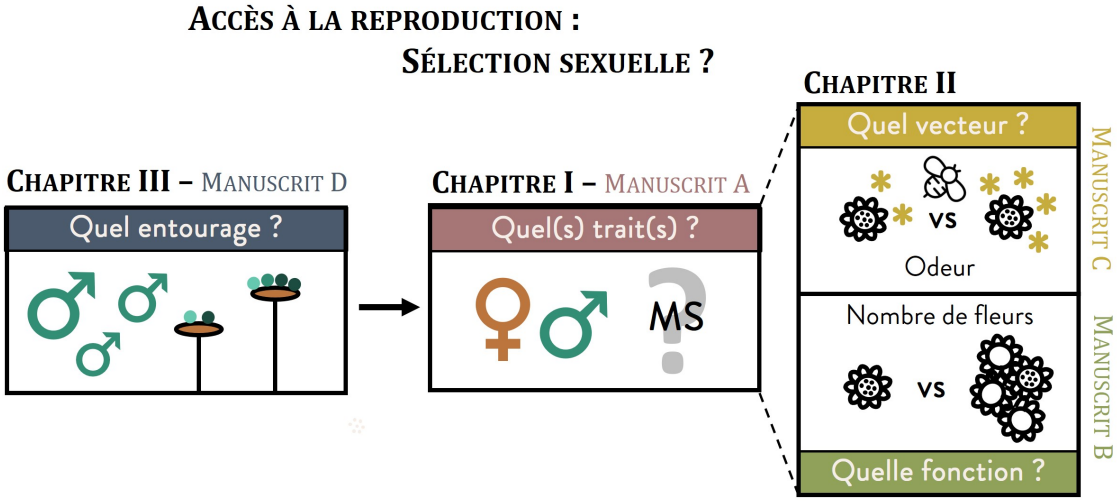


Figure 14: Plan illustré de la thèse, structurée en trois chapitres.

fait que cette espèce est dioïque permet de s'affranchir des conflits génétiques possibles entre les fonctions sexuelles des espèces hermaphrodites. Enfin, la pollinisation est médiée par les insectes. Il était ainsi possible d'étudier comment la sélection médiée par les pollinisateurs se recoupe avec la sélection sexuelle. D'un point de vue logistique, sa forte prévalence dans le Nord simplifie la mise en place de populations expérimentales et les suivis de populations *in natura*.

4.2 Les questions posées

Dans cette thèse, intitulée « Accès à la reproduction chez *Silene dioica*, une espèce dioïque entomophile », différentes méthodes seront utilisées pour comprendre comment les traits floraux peuvent permettre d'accéder à la reproduction, à différentes échelles, et selon le contexte écologique (Figure 14).

Dans le chapitre I, intitulé « Sélections sexe-spécifiques », nous nous attacherons à caractériser les traits sous sélection naturelle et sexuelle chez les deux sexes. La sélection sexuelle est estimée à l'aide du *genetic mating success*, afin de définir les effets de la diversité de partenaires sexuels en termes de succès reproducteur chez les deux sexes. Les méthodes de supplémentation en pollen évoquées précédemment sont également appliquées, afin d'estimer la sélection médiée par les pollinisateurs (supposément sélection sexuelle pré-pollinisation) chez les femelles.

Dans le chapitre II, intitulé « Rôle des pollinisateurs dans la sélection », nous nous attacherons à préciser les processus de sélection impliqués sur deux traits : le nombre de fleurs (manuscrit B) et un composé organique volatile important dans l'attraction des pollinisateurs, le phenylacetyladehyde (PAA, manuscrit C). Ces expérimentations faisaient appel à des manipulations phénotypiques sur ces traits, pour augmenter l'attractivité a priori sans modifier le nombre de gamètes. Cela permettait ainsi de discriminer les différentes formes

de sélection, c'est-à-dire sélection par le biais de l'attraction des pollinisateurs versus sélection de fécondité. Dans le manuscrit B, l'étude visait à tester l'hypothèse de la fonction mâle, évoquée dans l'introduction, qui montre aujourd'hui peu d'appuis empiriques dans la littérature (Tableau 1). Dans le manuscrit C, l'étude de l'effet du PAA est croisé avec un protocole d'exclusion des pollinisateurs (pollinisation diurne versus nocturne). Cette étude visait à déterminer l'importance des odeurs pour les pollinisateurs diurnes versus nocturnes, et à comprendre comment une exacerbation de l'emission d'un composé impliqué dans l'attraction peut changer la sélection sur les autres traits floraux.

Enfin, le chapitre III décrit une étude en populations naturelles de *Silene dioica*. Contrairement aux trois études précédentes, les effets des traits en termes d'accès à la reproduction sont estimés en amont dans la chaine de reproduction, au niveau gamétique. Cette étude vise ainsi à comprendre les déterminants de l'accès au pollen dans des populations naturelles aux caractéristiques variées. Les effets des caractéristiques à l'échelle de la population, à l'échelle du voisinage proche et en termes de traits floraux sur la charge pollinique sont ainsi explorés.

References

Ackerman, J. D. (2000). Abiotic pollen and pollination: ecological, functional, and evolutionary perspectives. *Plant Systematics and Evolution*, 222:167–185.

Aizen, M. A. et Harder, L. D. (2007). Expanding the limits of the pollen-limitation concept: effects of pollen quantity and quality. *Ecology*, 88:271–281.

Alonzo, S. H. et Servedio, M. R. (2019). Grey zones of sexual selection: why is finding a modern definition so hard? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286:20191325.

Andersson, M. (1994). *Sexual selection*. Princeton University Press.

Andersson, M. et Iwasa, Y. (1996). Sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 11:53–58.

Andersson, M. et Simmons, L. W. (2006). Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology & Evolution*, 21:296–302.

Anthes, N., David, P., Auld, J. R., Hoffer, J. N. A., Jarne, P., Koene, J. M., Kokko, H., Lorenzi, M. C., Pélissié, B., Sprenger, D., Staikou, A., et Schärer, L. (2010). Bateman gradients in hermaphrodites: an extended approach to quantify sexual selection. *The American Naturalist*, 176:249–263.

Anthes, N., Häderer, I. K., Michiels, N. K., et Janicke, T. (2016). Measuring and interpreting sexual selection metrics: evaluation and guidelines. *Methods in Ecology and Evolution*, 8:918–931.

Arnold, S. J. (1983). Sexual selection: the interface of theory and empiricism. Dans *Mate choice*. Cambridge University Press, Cambridge.

Arnold, S. J. (1994a). Bateman's principles and the measurement of sexual selection in plants and animals. *The American Naturalist*, 144:S126–S149.

Arnold, S. J. (1994b). Is there a unifying concept of sexual selection that applies to both plants and animals? *The American Naturalist*, 144:S1–S12.

Arnold, S. J. et Duvall, D. (1994). Animal mating systems: a synthesis based on selection theory. *The American Naturalist*, 143:317–348.

Arnqvist, G. (1998). Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. *Nature*, 393:784–786.

Aronsen, T., Berglund, A., Mobley, K. B., Ratikainen, I. I., et Rosenqvist, G. (2013). Sex ratio and density affect sexual selection in a sex-role reversed fish: sexual selection in a sex-role reversed fish. *Evolution*, 67:3243–3257.

Ashman, T.-L. (2009). Sniffing out patterns of sexual dimorphism in floral scent. *Functional Ecology*, 23:852–862.

Ashman, T.-L., Alonso, C., Parra-Tabla, V., et Arceo-Gómez, G. (2020). Pollen on stigmas as proxies of pollinator competition and facilitation: complexities, caveats and future directions. *Annals of Botany*, 125:1003–1012.

Ashman, T.-L. et Diefenderfer, C. (2001). Sex ratio represents a unique context for selection on attractive traits: consequences for the evolution of sexual dimorphism. *The American Naturalist*, 157:334–347.

Ashman, T.-L. et Majetic, C. J. (2006). Genetic constraints on floral evolution: a review and evaluation of patterns. *Heredity*, 96:343–352.

Ashman, T.-L. et Morgan, M. T. (2004). Explaining phenotypic selection on plant attractive characters: male function, gender balance or ecological context? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271:553–559.

Ashman, T.-L. et Stanton, M. (1991). Seasonal variation in pollination dynamics of sexually dimorphic *Sidalcea oregana* ssp. *spicata* (Malvaceae). *Ecology*, 72:993–1003.

Austen, E. J. et Weis, A. E. (2015). What drives selection on flowering time? An experimental manipulation of the inherent correlation between genotype and environment. *Evolution*, 69:2018–2033.

Austen, E. J. et Weis, A. E. (2016). The causes of selection on flowering time through male fitness in a hermaphroditic annual plant. *Evolution*, 70:111–125.

Baena-Díaz, F., Zemp, N., et Widmer, A. (2019). Insights into the genetic architecture of sexual dimorphism

from an interspecific cross between two diverging *Silene* (Caryophyllaceae) species. *Molecular Ecology*, 28:5052–5067.

Baker, H. G. (1947). *Melandrium dioicum* (L. emend) Coss. & Germ. *Journal of Ecology*, 35:283–292.

Barrett, S. C. H. (2002). The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, 3:274–284.

Barrett, S. C. H. (2010). Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365:99–109.

Barrett, S. C. H. et Hough, J. (2012). Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany*, 64:67–82.

Bateman, A. J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2:349–368.

Bawa, K. S. (1980). Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11:15–39.

Beekman, M., Nieuwenhuis, B., Ortiz-Barrientos, D., et Evans, J. P. (2016). Sexual selection in hermaphrodites, sperm and broadcast spawners, plants and fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371:20150541.

Bernasconi, G. (2003). Seed paternity in flowering plants: an evolutionary perspective. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 6:149–158.

Biesmeijer, J. C. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313:351–354.

Bishop, J. D. D. (2006). The third way: spermcast mating in sessile marine invertebrates. *Integrative and Comparative Biology*, 46:398–406.

Bjork, A. et Pitnick, S. (2006). Intensity of sexual selection along the anisogamy–isogamy continuum. *Nature*, 441:742–745.

Bolmgren, K., Eriksson, O., et Linder, H. P. (2003). Contrasting flowering phenology and species richness in abiotically and biotically pollinated angiosperms. *Evolution*, 57:2001–2011.

Bond, W. J. et Maze, K. E. (1999). Survival costs and reproductive benefits of floral display in a sexually dimorphic dioecious shrub, *Leucadendron xanthoconus*. *Evolutionary Ecology*, 13:1–18.

Brennan, P. L. R., Clark, C. J., et Prum, R. O. (2010). Explosive eversion and functional morphology of the duck penis supports sexual conflict in waterfowl genitalia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277:1309–1314.

Briscoe, A. D. et Chittka, L. (2001). The evolution of color vision in insect. *Annual Review of Entomology*, 46:471–510.

Briscoe Runquist, R. D., Geber, M. A., Pickett-Leonard, M., et Moeller, D. A. (2017). Mating system evolution under strong pollen limitation: evidence of disruptive selection through male and female fitness in *Clarkia xantiana*. *The American Naturalist*, 189:549–563.

Broyles, S. B. et Wyatt, R. (1990). Paternity analysis in a natural population of *Asclepias exaltata*: multiple paternity, functional gender, and the "pollen-donation hypothesis". *Evolution*, 44:1454–1468.

Burd, M. (1994). Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. *The Botanical Review*, 60:83–139.

Burd, M. et Callahan, H. S. (2000). What does the male function hypothesis claim? *Journal of Evolutionary Biology*, 13:735–742.

Burt, A. (2000). Perspective: sex, recombination, and the efficacy of selection - was Weismann right? *Evolution*, 54:337–351.

Campbell, D. R. (2009). Using phenotypic manipulations to study multivariate selection of floral trait associations. *Annals of Botany*, 103:1557–1566.

Campbell, D. R. et Powers, J. M. (2015). Natural selection on floral morphology can be influenced by climate. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282:20150178.

Carlsson-Granér, U. (1997). Anther-smut disease in *Silene dioica*: variation in susceptibility among genotypes and populations, and patterns of disease within populations. *Evolution*, 51:1416–1426.

Carr, D. E., Haber, A. I., LeCroy, K. A., Lee, D. E., et Link, R. I. (2015). Variation in reward quality and pollinator attraction: the consumer does not always get it right. *AoB PLANTS*, 7:plv034.

Caruso, C. M., Eisen, K. E., Martin, R. A., et Sletvold, N. (2019). A meta-analysis of the agents of selection on floral traits. *Evolution*, 73:4–14.

Chaine, A. S. et Lyon, B. E. (2008). Adaptive plasticity in female mate choice dampens sexual selection on male ornaments in the lark bunting. *Science*, 319:459–462.

Charnov, E. L. (1979). Simultaneous hermaphroditism and sexual selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76:2480–2484.

Chittka, L. et Thomson, J. D. (2001). Behavioral responses of pollinators to variation in floral display size and their influences on the evolution of floral traits. Dans *Cognitive ecology of pollination - animal behavior and floral evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.

Christopher, D. A., Mitchell, R. J., et Karron, J. D. (2020). Pollination intensity and paternity in flowering plants. *Annals of Botany*, 125:1–9.

Cocucci, A. A., Marino, S., Baranzelli, M., Wiemer, A. P., et Sérsic, A. (2014). The buck in the milkweed: evidence of male-male interference among pollinaria on pollinators. *New Phytologist*, 203:280–286.

Conner, J. K. et Rush, S. (1996). Effects of flower size and number on pollinator visitation to wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia*, 105:509–516.

Conner, J. K., Rush, S., et Jennetten, P. (1996a). Measurements of natural selection on floral traits in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). I. Selection through lifetime female fitness. *Evolution*, 50:1127–1136.

Conner, J. K., Rush, S., Kercher, S., et Jennetten, P. (1996b). Measurements of natural selection on floral traits in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). II. Selection through lifetime male and total fitness. *Evolution*, 50:1137–1146.

Cruden, R. W. (2000). Pollen grains: Why so many? *Plant Systematics and Evolution*, 222:143–165.

Cuevas, E., Pérez, M. Á., et Sevillano, L. (2017). Population size, sex-ratio and sexual dimorphism in *Fuchsia parviflora* (Onagraceae) an endemic dioecious shrub. *Botanical Sciences*, 95:401.

Dai, C. et Galloway, L. F. (2011). Do dichogamy and herkogamy reduce sexual interference in a self-incompatible species? *Functional Ecology*, 25:271–278.

Dai, C. et Galloway, L. F. (2013). Sexual selection in a hermaphroditic plant through female reproductive success. *Journal of Evolutionary Biology*, 26:2622–2632.

Darwin, C. (1859). *On the origin of species*. John Murray, London.

Darwin, C. (1862). *On the various contrivances by which british and foreign orchids are fertilized by insects*, volume 10. London.

Darwin, C. (1871). *The descent of man, and selection in relation to sex*. John Murray, London.

De Cauwer, I., Arnaud, J.-F., Klein, E. K., et Düfay, M. (2012). Disentangling the causes of heterogeneity in male fecundity in gynodioecious *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *New Phytologist*, 195:676–687.

De Lisle, S. P. et Rowe, L. (2015). Ecological character displacement between the sexes. *The American Naturalist*, 186:693–707.

Delle-Vedove, R., Schatz, B., et Düfay, M. (2017). Understanding intraspecific variation of floral scent in light of evolutionary ecology. *Annals of Botany*, 120:1–20.

Delph, L. F. (1996). Flower size dimorphism in plants with unisexual flowers. Dans *Floral biology*. Springer, Boston.

Delph, L. F. et Ashman, T.-L. (2006). Trait selection in flowering plants: how does sexual selection contribute? *Integrative and Comparative Biology*, 46:465–472.

Delph, L. F., Galloway, L. F., et Stanton, M. L. (1996). Sexual dimorphism in flower size. *The American Naturalist*, 148:299–320.

Devlin, B. et Ellstrand, N. C. (1990). Male and Female Fertility Variation in Wild Radish, a Hermaphrodite. *The American Naturalist*, 136:21.

Devlin, B., Roeder, K., et Ellstrand, N. C. (1988). Fractional paternity assignment: theoretical development and comparison to other methods. *Theoretical and Applied Genetics*, 76:369–380.

Douglas, K. L. et Cruden, R. W. (1994). The reproductive biology of *Anemone canadensis* (Ranunculaceae): breeding system and facilitation of sexual selection. *American Journal of Botany*, 81:314–321.

Draper, J. T., Conran, J. G., Crouch, N., Weinstein, P., et Simpson, B. S. (2020). Sexual dimorphism in

the dioecious monocot *Lomandra leucocephala* ssp. *robusta* and its potential ecosystem and conservation significance. *Australian Journal of Botany*, 68:275–287.

Eberhard, W. (1985). *Sexual selection and animal genitalia*. Harvard University Press, Cambridge.

Eberhard, W. G. (2009). Postcopulatory sexual selection: Darwin's omission and its consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106:10025–10032.

Eckhart, V. M. (1999). Sexual dimorphism in flowers and inflorescences. Dans *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin.

Elle, E. (1999). Sex allocation and reproductive success in the andromonoecious perennial *Solanum carolinense* (Solanaceae). I. Female success. *American Journal of Botany*, 86:278–286.

Elle, E. et Meagher, T. R. (2000). Sex allocation and reproductive success in the andromonoecious perennial *Solanum carolinense* (Solanaceae). II. Paternity and functional gender. *The American Naturalist*, 156:622–636.

Elzinga, J. A., Atlan, A., Biere, A., Gigord, L., Weis, A. E., et Bernasconi, G. (2007). Time after time: flowering phenology and biotic interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 22:432–439.

Emlen, S. et Oring, L. (1977). Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, 197:215–223.

Fisher, H. S., Giomi, L., Hoekstra, H. E., et Mahadevan, L. (2014). The dynamics of sperm cooperation in a competitive environment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281:20140296.

Fisher, R. A. (1915). The evolution of sexual preference. *The Eugenics Review*, 7:184–192.

Fisher, R. A. (1930). *The genetical theory of natural selection*. Oxford Clarendon Press.

Forrest, J. R. K. (2014). Plant size, sexual selection, and the evolution of protandry in dioecious plants. *The American Naturalist*, 184:338–351.

Fuller, R. C. (2009). A test of the critical assumption of the sensory bias model for the evolution of female mating preference using neural networks. *Evolution*, 63:1697–1711.

Galen, C., Shykoff, J. A., et Plowright, R. C. (1986). Consequences of stigma receptivity schedules for sexual selection in flowering plants. *The American Naturalist*, 127:462–476.

Ganeshaiah, K. N. et Uma Shaanker, R. (1988). Regulation of seed number and female incitation of mate competition by a pH-dependent proteinaceous inhibitor of pollen grain germination in *Leucaena leucocephala*. *Oecologia*, 75:110–113.

Gauthey, Z., Tentelier, C., Lepais, O., Elosegi, A., Royer, L., Glise, S., et Labonne, J. (2017). With our powers combined: integrating behavioral and genetic data to estimate mating success and sexual selection. *Rethinking Ecology*, 2:1–26.

Gegear, R. J. et Burns, J. G. (2007). The birds, the bees, and the virtual flowers: can pollinator behavior drive ecological speciation in flowering plants? *The American Naturalist*, 170:551–566.

Gehring, J. L., Scoby, J., Parsons, M., et Delph, L. F. (2004). Whole-plant investment in nectar is greater for males than pollinated females in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Evolutionary Ecology Research*, 6:1237–1252.

Gowaty, P. A., Kim, Y.-K., et Anderson, W. W. (2012). No evidence of sexual selection in a repetition of Bateman's classic study of Drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:11740–11745.

Gowaty, P. A., Kim, Y.-K., et Anderson, W. W. (2013). Mendel's law reveals fatal flaws in Bateman's 1948 study of mating and fitness. *Fly*, 7:28–38.

Grant, V. (1995). Sexual selection in plants: pros and cons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92:1247–1250.

Halfwerk, W., Blaas, M., Kramer, L., Hijner, N., Trillo, P. A., Bernal, X. E., Page, R. A., Goutte, S., Ryan, M. J., et Ellers, J. (2019). Adaptive changes in sexual signalling in response to urbanization. *Nature Ecology & Evolution*, 3:374–380.

Harder, L. D. et Johnson, S. D. (2009). Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytologist*, 183:530–545.

Hasegawa, Y., Suyama, Y., et Seiwa, K. (2015). Variation in pollen-donor composition among pollinators

in an entomophilous tree species, *Castanea crenata*, revealed by single-pollen genotyping. *PLOS ONE*, 10:e0120393.

Hemborg, Å. M. (1998). Seasonal dynamics in reproduction of first-year females and males in *Silene dioica*. *International Journal of Plant Sciences*, 159:958–967.

Henshaw, J. M., Jennions, M. D., et Kruuk, L. E. B. (2018). How to quantify (the response to) sexual selection on traits. *Evolution*, 72:1904–1917.

Henshaw, J. M. et Jones, A. G. (2020). Fisher's lost model of runaway sexual selection. *Evolution*, 74:487–494.

Henshaw, J. M., Kahn, A. T., et Fritzsche, K. (2016). A rigorous comparison of sexual selection indexes via simulations of diverse mating systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113:E300–E308.

Hoballah, M. E., Gübitz, T., Stuurman, J., Broger, L., Barone, M., Mandel, T., Dell'Olivo, A., Arnold, M., et Kuhlemeier, C. (2007). Single gene–mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. *The Plant Cell*, 19:779–790.

Hodges, S. A. (1995). The influence of nectar production on hawkmoth behavior, self-pollination, and seed production in *Mirabilis multiflora* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany*, 82:197–204.

Hodgins, K. A. et Barrett, S. C. H. (2008). Natural selection on floral traits through male and female function in wild populations of the heterostylous daffodil *Narcissus triandrus*. *Evolution*, 62:1751–1763.

Hoffer, J. N., Mariën, J., Ellers, J., et Koene, J. M. (2017). Sexual selection gradients change over time in a simultaneous hermaphrodite. *eLife*, 6:e25139.

Holland, B. et Rice, W. R. (1999). Experimental removal of sexual selection reverses intersexual antagonistic coevolution and removes a reproductive load. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96:5083–5088.

Hoquet, T. (2020). Bateman (1948): rise and fall of a paradigm? *Animal Behaviour*, 164:223–231.

Hoquet, T., Bridges, W. C., et Gowaty, P. A. (2020). Bateman's data: inconsistent with "Bateman's principles". *Ecology and Evolution*, 10:10325–10342.

Huber, F. K., Kaiser, R., Sauter, W., et Schiestl, F. P. (2005). Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (Orchidaceae). *Oecologia*, 142:564–575.

Jalas, J. et Suhominen, J. (1986). *Atlas florae europaeae: distribution of vascular plants in Europe. 7. Caryophyllaceae (Silenoideae)*. Cambridge University Press, Cambridge.

Jamieson, B. G. M. (2003). *Reproductive biology and phylogeny of urodela*. CRC Press, Boca Raton.

Janicke, T., Häderer, I. K., Lajeunesse, M. J., et Anthes, N. (2016). Darwinian sex roles confirmed across the animal kingdom. *Science Advances*, 2:e1500983.

Janzen, D. H. (1977). A note on optimal mate selection by plants. *The American Naturalist*, 111:365–371.

Jennions, M. D. et Kokko, H. (2010). Sexual selection. Dans *Evolutionary behavioral ecology*. Oxford University Press, Oxford.

Johnson, M. G. et Shaw, A. J. (2016). The effects of quantitative fecundity in the haploid stage on reproductive success and diploid fitness in the aquatic peat moss *Sphagnum macrophyllum*. *Heredity*, 116:523–530.

Jones, A. G. (2009). On the opportunity for sexual selection, the Bateman gradient and the maximum intensity of sexual selection. *Evolution*, 63:1673–1684.

Jones, A. G. et Ardren, W. R. (2003). Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*, 12:2511–2523.

Jones, A. G., Arguello, J. R., et Arnold, S. J. (2002). Validation of Bateman's principles: a genetic study of sexual selection and mating patterns in the rough–skinned newt. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269:2533–2539.

Jones, A. G. et Ratterman, N. L. (2009). Mate choice and sexual selection: What have we learned since Darwin? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106:10001–10008.

Jones, A. G., Rosenqvist, G., Berglund, A., Arnold, S. J., et Avise, J. C. (2000). The Bateman gradient and the cause of sexual selection in a sex–role–reversed pipefish. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267:677–680.

Jormalainen, V. (1998). Precopulatory mate guarding in crustaceans: male competitive strategy and intersexual conflict. *The Quarterly Review of Biology*, 73:275–304.

Järvenpää, M. et Lindström, K. (2004). Water turbidity by algal blooms causes mating system breakdown in a shallow-water fish, the sand goby *Pomatoschistus minutus*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271:2361–2365.

Jürgens, A., Witt, T., et Gottsberger, G. (1996). Reproduction and pollination in Central European populations of *Silene* and *Saponaria* species. *Botanica Acta*, 109:316–324.

Kalinowski, S. T., Taper, M. L., et Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16:1099–1106.

Kaul, V. et Raina, M. (2020). Sexual selection in angiosperms: paradox re-visited. Dans *Reproductive ecology of flowering plants: patterns and processes*. Springer, Singapore.

Kay, Q. O. N., Lack, A. J., Bamber, F. C., et Davies, C. R. (1984). Differences between sexes in floral morphology, nectar production and insect visits in a dioecious species, *Silene dioica*. *New Phytologist*, 98:515–529.

Keller, L. et Reeve, H. K. (1995). Why do females mate with multiple males? The sexually selected sperm hypothesis. *Advances in the Study of Behavior*, 24:291–315.

Kenrick, J. et Knox, R. B. (1982). Function of the polyad in reproduction of acacia. *Annals of Botany*, 50:721–727.

Klinkhamer, P. G. L. et de Jong, T. J. (1990). Effects of plant size, plant density and sex differential nectar reward on pollinator visitation in the protandrous *Echium vulgare* (boraginaceae). *Oikos*, 57:399–405.

Klug, H., Heuschele, J., Jennions, M. D., et Kokko, H. (2010). The mismeasurement of sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 23:447–462.

Knight, T. M., Steets, J. A., et Ashman, T.-L. (2006). A quantitative synthesis of pollen supplementation experiments highlights the contribution of resource reallocation to estimates of pollen limitation. *American Journal of Botany*, 93:271–277.

Knight, T. M., Steets, J. A., Vamosi, J. C., Mazer, S. J., Burd, M., Campbell, D. R., Dudash, M. R., Johnston, M. O., Mitchell, R. J., et Ashman, T.-L. (2005). Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36:467–497.

Kokko, H., Klug, H., et Jennions, M. D. (2012). Unifying cornerstones of sexual selection: operational sex ratio, Bateman gradient and the scope for competitive investment. *Ecology Letters*, 15:1340–1351.

Kokko, H. et Rankin, D. J. (2006). Lonely hearts or sex in the city? Density-dependent effects in mating systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361:319–334.

Kotiaho, J., Lebas, N., Puurtinen, M., et Tomkins, J. (2008). On the resolution of the lek paradox. *Trends in Ecology & Evolution*, 23:1–3.

Kuijper, B., Pen, I., et Weissing, F. J. (2012). A guide to sexual selection theory. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43:287–311.

Kulbaba, M. W. et Worley, A. C. (2012). Selection on floral design in *Polemonium brandegeei* (Polemoniaceae): female and male fitness under hawkmoth pollination. *Evolution*, 66:1344–1359.

Kulbaba, M. W. et Worley, A. C. (2013). Selection on floral design in *Polemonium brandegeei* (Polemoniaceae): female and male fitness under hawkmoth pollination. *Evolution*, 67:2194–2206.

Kvarnemo, C. et Simmons, L. W. (2013). Polyandry as a mediator of sexual selection before and after mating. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368:20120042.

Käfer, J., Marais, G. A. B., et Pannell, J. R. (2017). On the rarity of dioecy in flowering plants. *Molecular Ecology*, 26:1225–1241.

Lande, R. et Arnold, S. J. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 37:1210–1226.

Lankinen, Å. et Karlsson Green, K. (2015). Using theories of sexual selection and sexual conflict to improve our understanding of plant ecology and evolution. *AoB PLANTS*, 7:plv008.

Lankinen, Å., Maad, J., et Armbruster, W. S. (2009). Pollen-tube growth rates in *Collinsia heterophylla* (Plantaginaceae): one-donor crosses reveal heritability but no effect on sporophytic-offspring fitness. *Annals of Botany*, 103:941–950.

Lehtonen, J., Jennions, M. D., et Kokko, H. (2012). The many costs of sex. *Trends in Ecology & Evolution*, 27:172–178.

Leonard, J. L. (2006). Sexual selection: lessons from hermaphrodite mating systems. *Integrative and Comparative Biology*, 46:349–367.

Levitan, D. (1998). Does bateman's principle apply to broadcast-spawning organisms? Egg traits influence in situ fertilization rates among congeneric sea urchins. *Evolution*, 52:1043–1056.

Levitan, D. R. (1993). The Importance of Sperm Limitation to the Evolution of Egg Size in Marine Invertebrates. *The American Naturalist*, 141:517–536.

Levitan, D. R. (2004). Density-dependent sexual selection in external fertilizers: variances in male and female fertilization success along the continuum from sperm limitation to sexual conflict in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *The American Naturalist*, 164:298–309.

Levitan, D. R. (2008). Gamete traits influence the variance in reproductive success, the intensity of sexual selection, and the outcome of sexual conflict among congeneric sea urchins. *Evolution*, 62:1305–1316.

Levitan, D. R. (2010). Sexual selection in external fertilizers. Dans *Evolutionary behavioral ecology*. Oxford University Press, Oxford.

Levitan, D. R. et Irvine, S. D. (2001). Fertilization selection on egg and jelly-coat size in the sand dollar *Dendraster excentricus*. *Evolution*, 55:2479–2483.

Lloyd, D. G. et Webb, C. J. (1977). Secondary sex characters in plants. *The Botanical Review*, 43:177–216.

Lozano, G. A., Perreault, S., et Lemon, R. E. (1996). Age, arrival date and reproductive success of male american redstarts *Setophaga ruticilla*. *Journal of Avian Biology*, 27:164–170.

Lughadha, E. N., Govaerts, R., Belyaeva, I., Black, N., Lindon, H., Allkin, R., Magill, R. E., et Nicolson, N. (2016). Counting counts: revised estimates of numbers of accepted species of flowering plants, seed plants, vascular plants and land plants with a review of other recent estimates. *Phytotaxa*, 272:82–88.

Marshall, D. L. (1991). Mate choice in plants: an anatomical to population perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22:37–63.

Marshall, D. L. et Ellstrand, N. C. (1986). Sexual selection in *Raphanus sativus*: experimental data on nonrandom fertilization, maternal choice, and consequences of multiple paternity. *The American Naturalist*, 127:446–461.

Marshall, D. L. et Ellstrand, N. C. (1988). Effective mate choice in wild radish: evidence for selective seed abortion and its mechanism. *The American Naturalist*, 131:739–756.

Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B., et Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7:639–655.

Matsumoto, K. (1987). Mating patterns of a sphragis-bearing butterfly, *Luehdorfia japonica* Leech (Lepidoptera: Papilionidae), with descriptions of mating behavior. *Researches on Population Ecology*, 29:97–110.

Matsumura, S., Arlinghaus, R., et Dieckmann, U. (2012). Standardizing selection strengths to study selection in the wild: a critical comparison and suggestions for the future. *BioScience*, 62:1039–1054.

Ming, R., Bendahmane, A., et Renner, S. S. (2011). Sex chromosomes in land plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62:485–514.

Minnaar, C. et Anderson, B. (2019). Using quantum dots as pollen labels to track the fates of individual pollen grains. *Methods in Ecology and Evolution*, 10:604–614.

Minnaar, C., Anderson, B., de Jager, M. L., et Karron, J. D. (2019). Plant–pollinator interactions along the pathway to paternity. *Annals of Botany*, 123:225–245.

Mobley, K. B. et Jones, A. G. (2012). Overcoming statistical bias to estimate genetic mating systems in open populations: a comparison of Bateman's principles between the sexes in a sexrolereversed pipefish. *Evolution*, 67:646–660.

Møller, A. P., Balbontín, J., Cuervo, J. J., Hermosell, I. G., et de Lope, F. (2008). Individual differences in protandry, sexual selection, and fitness. *Behavioral Ecology*, 20:433–440.

Moore, J. C. et Pannell, J. R. (2011). Sexual selection in plants. *Current Biology*, 21:R176–R182.

Moore, N., Kelly, P., Cahill, J., et Hayden, T. (1995). Mating strategies and mating success of fallow (*Dama dama*) bucks in a non-lekking population. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 36:91–100.

Moquet, L., Lateur, L., Jacquemart, A.-L., De Cauwer, I., et Düfay, M. (2020). Temporal dynamics of sexual dimorphism in a dioecious species. *Annals of Botany*, 126:471–480.

Morgan, M. T. (1994). Models of sexual selection in hermaphrodites, especially plants. *The American Naturalist*, 144:S100–S125.

Morgan, M. T. et Conner, J. K. (2001). Using Genetic Markers to Directly Estimate Male Selection Gradients. *Evolution*, 55:272–281.

Mori, E., Mazza, G., et Lovari, S. (2017). Sexual dimorphism. Dans *Encyclopedia of animal cognition and behavior*. Springer International Publishing, Cham.

Morisita, M. (1962). I_d-index, a measure of dispersion of individuals. *Res. Popul. Ecol.*, pages 1–7.

Mouginot, P., Prügel, J., Thom, U., Steinhoff, P. O., Kupryjanowicz, J., et Uhl, G. (2015). Securing paternity by mutilating female genitalia in spiders. *Current Biology*, 25:2980–2984.

Muller, H. J. (1932). Some genetic aspects of sex. *The American Naturalist*, 66:118–138.

Munguia-Rosas, M. A., Ollerton, J., et Parra-Tabla, V. (2011). Phenotypic selection on flowering phenology and size in two dioecious plant species with different pollen vectors. *Plant Species Biology*, 26:205–212.

Murdy, W. H. et Carter, M. E. B. (1987). Regulation of the timing of pollen germination by the pistil in *Talinum mengesii* (Portulacaceae). *American Journal of Botany*, 74:1888–1892.

Murphy, C. G. (1998). Interaction-independent sexual selection and the mechanisms of sexual selection. *Evolution*, 52:8–18.

Nicolson, S. W. (2011). Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, 46:197–204.

O'Connell, L. M. et Johnston, M. O. (1998). Male and female pollination success in a deceptive orchid, a selection study. *Ecology*, 79:1246–1260.

Okamoto, T., Kawakita, A., Goto, R., Svensson, G. P., et Kato, M. (2013). Active pollination favours sexual dimorphism in floral scent. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280:20132280.

Ollerton, J. (2017). Pollinator diversity: distribution, ecological function, and conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48:353–376.

Ollerton, J., Winfree, R., et Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120:321–326.

Orr, H. A. (2009). Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature Reviews Genetics*, 10:531–539.

Otto, S. P. et Lenormand, T. (2002). Resolving the paradox of sex and recombination. *Nature Reviews Genetics*, 3:252–261.

Pannell, J. R. et Labouche, A.-M. (2013). The incidence and selection of multiple mating in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368:20120051.

Parker, A. (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*, 7:525–567.

Parker, G., Baker, R., et Smith, V. (1972). The origin and evolution of gamete dimorphism and the male-female phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*, 36:529–553.

Parker, G. A. (2020). Conceptual developments in sperm competition: a very brief synopsis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375:20200061.

Pasonen, H. L., Pulkkinen, P., Kapyla, M., et Blom, A. (1999). Pollen-tube growth rate and seed-siring success among *Betula pendula clones*. 143:243–251.

Pischedda, A. et Rice, W. R. (2012). Partitioning sexual selection into its mating success and fertilization success components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:2049–2053.

Pleasants, J. M. (1981). Bumblebee response to variation in nectar availability. *Ecology*, 62:1648–1661.

Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., et Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25:345–353.

Pélabon, C., Hennet, L., Bolstad, G. H., Albertsen, E., Opedal, Ø. H., Ekrem, R. K., et Armbruster, W. S. (2016). Does stronger pollen competition improve offspring fitness when pollen load does not vary? *American Journal of Botany*, 103:522–531.

Pélissié, B., Jarne, P., Sarda, V., et David, P. (2014). Disentangling precopulatory and postcopulatory sexual

selection in polyandrous species. *Evolution*, 68:1320–1331.

Queller, D. C. (1983). Sexual selection in a hermaphroditic plant. *Nature*, 305:706–707.

Raguso, R. A. (2008). Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39:549–569.

Ramesha, B. T., Yetish, M. D., Ravikanth, G., Ganeshaiah, K. N., Ghazoul, J., et Shaanker, R. U. (2011). Stylish lengths: mate choice in flowers. *Journal of Biosciences*, 36:229–234.

Raven, H. R., Eichhorn, S. E., et Evert, R. F. (2014). *Biologie végétale*. De Boeck, Bruxelles.

Renner, S. S. (2014). The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. *American Journal of Botany*, 101:1588–1596.

Robertson, A. W., Mountjoy, C., Faulkner, B. E., Roberts, M. V., et Macnair, M. R. (1999). Bumble bee selection of *Mimulus guttatus* flowers: the effects of pollen quality and reward depletion. 80:2594–2606.

Rowe, L. et Houle, D. (1996). The lek paradox and the capture of genetic variance by condition dependent traits. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 263:1415–1421.

Ruzzante, D. E., Hamilton, D. C., Kramer, D. L., et Grant, J. W. A. (1996). Scaling of the variance and the quantification of resource monopolization. *Behavioral Ecology*, 7:199–207.

Sahli, H. F. et Conner, J. K. (2011). Testing for conflicting and nonadditive selection: floral adaptation to multiple pollinators through male and female fitness. *Evolution*, 65:1457–1473.

Sandring, S. et Ågren, J. (2009). Pollinator-mediated selection on floral display and flowering time in the perennial herb *Arabidopsis lyrata*. *Evolution*, 63:1292–1300.

Sari-Gorla, M., Pé, M. E., Mulcahy, D. L., et Ottaviano, E. (1992). Genetic dissection of pollen competitive ability in maize. *Heredity*, 69:423–430.

Schiestl, F. P. (2010). The evolution of floral scent and insect chemical communication. *Ecology Letters*, 13:643–656.

Searcy, W. A. et Andersson, M. (1986). Sexual selection and the evolution of song. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17:507–533.

Senar, J. C., Figuerola, J., et Pascual, J. (2002). Brighter yellow blue tits make better parents. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269:257–261.

Shine, R. (1989). Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. *The Quarterly Review of Biology*, 64:419–460.

Simmons, L. W. (2001). *Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects*. Princeton University Press.

Simmons, L. W. et Fitzpatrick, J. L. (2012). Sperm wars and the evolution of male fertility. *Reproduction*, 144:519–534.

Skogsmyr, I. et Lankinen, Å. (2002). Sexual selection: an evolutionary force in plants? *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 77:537–562.

Sletvold, N. et Ågren, J. (2010). Pollinator-mediated selection on floral display and spur length in the orchid *Gymnadenia conopsea*. *International Journal of Plant Sciences*, 171:999–1009.

Snow, A. A. et Mazer, S. J. (1988). Gametophytic selection in *Raphanus raphanistrum*: a test for heritable variation in pollen competitive ability. *Evolution*, 42:1065–1075.

Snow, A. A. et Spira, T. P. (1991). Pollen vigour and the potential for sexual selection in plants. *Nature*, 352:796–797.

Snyder, B. F. et Gowaty, P. A. (2007). A reappraisal of Bateman's classic study of intrasexual selection. *Evolution*, 61:2457–2468.

Speijer, D., Lukeš, J., et Eliáš, M. (2015). Sex is a ubiquitous, ancient, and inherent attribute of eukaryotic life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112:8827–8834.

Stanton, M., Young, H. J., Ellstrand, N. C., et Clegg, J. M. (1991). Consequences of floral variation for male and female reproduction in experimental populations of wild radish, *Raphanus sativus* I. *Evolution*, 45:268–280.

Stanton, M. L., Snow, A. A., et Handel, S. N. (1986). Floral evolution: attractiveness to pollinators increases male fitness. *Science, New Series*, 232:1625–1627.

Stephenson, A. G. et Bertin, R. I. (1983). Male competition, female choice and sexual selection in plants. Dans *Pollination biology*. Academic Press, Orlando.

Strauss, S. Y. et Whittall, J. B. (2006). Non-pollinator agents of selection on floral traits. Dans *Ecology and evolution of flowers*, pages 120–138. Oxford University Press, Oxford.

Sutherland, W. J. (1985). Chance can produce a sex difference in variance in mating success and explain Bateman's data. *Animal Behaviour*, 33:1349–1352.

Sutter, A. et Immler, S. (2020). Within-ejaculate sperm competition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375:20200066.

Tang-Martinez, Z. (2005). The problem with paradigms: Bateman's worldview as a case study. *Integrative and Comparative Biology*, 45:821–830.

Tang-Martinez, Z. (2012). Repetition of Bateman challenges the paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:11476–11477.

Tang-Martínez, Z. (2016). Rethinking Bateman's principles: challenging persistent myths of sexually reluctant females and promiscuous males. *The Journal of Sex Research*, 53:532–559.

Tejaswini, K., Ganeshaiah, N., et Shaanker, R. (2001). Sexual selection in plants: the process, components and significance. *Proc. Indian natn Sci Acad.*, 6:423–432.

Thomann, M., Imbert, E., Devaux, C., et Cheptou, P.-O. (2013). Flowering plants under global pollinator decline. *Trends in Plant Science*, 18:353–359.

Togashi, T., Bartelt, J. L., Yoshimura, J., Tainaka, K.-I., et Cox, P. A. (2012). Evolutionary trajectories explain the diversified evolution of isogamy and anisogamy in marine green algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:13692–13697.

Tonnabel, J., David, P., Klein, E. K., et Pannell, J. R. (2019a). Sex-specific selection on plant architecture through "budget" and "direct" effects in experimental populations of the wind-pollinated herb, *Mercurialis annua*. *Evolution*, 73:897–912.

Tonnabel, J., David, P., et Pannell, J. R. (2019b). Do metrics of sexual selection conform to Bateman's principles in a wind-pollinated plant? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286:20190532.

Trivers, R. (1972). Parental investment and sexual selection. Dans *Sexual selection and the descent of man*, pages 136–179. Aldine DeGruyter, New York.

Tsuji, K., Kobayashi, K., Hasegawa, E., et Yoshimura, J. (2020). Dimorphic flowers modify the visitation order of pollinators from male to female flowers. *Scientific Reports*, 10:9965.

van Kleunen, M. et Ritland, K. (2004). Predicting evolution of floral traits associated with mating system in a natural plant population. *Journal of Evolutionary Biology*, 17:1389–1399.

Wade, M. J. (1979). Sexual selection and variance in reproductive success. *The American Naturalist*, 114:742–764.

Wade, M. J. et Arnold, S. J. (1980). The intensity of sexual selection in relation to male sexual behaviour, female choice, and sperm precedence. *Animal Behaviour*, 28:446–461.

Warmke, H. E. (1946). Sex determination and sex balance in *Melandrium*. *American Journal of Botany*, 33:648–660.

Weismann, A. (1893). *The Germ-plasm: a theory of heredity*. Scribner, New York.

Westerbergh, A. et Saura, A. (1994). Gene flow and pollinator behaviour in *Silene dioica* populations. *Oikos*, 71:215–224.

Whitfield, J. (2004). Everything you always wanted to know about sexes. *PLoS Biology*, 2:e183.

Whittall, J. B. et Hodges, S. A. (2007). Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature*, 447:706–709.

Wilkinson, G. S., Breden, F., Mank, J. E., Ritchie, M. G., Higginson, A. D., Radwan, J., Jaquiery, J., Salzburger, W., Arriero, E., Barribeau, S. M., Phillips, P. C., Renn, S. C. P., et Rowe, L. (2015). The locus of sexual selection: moving sexual selection studies into the post-genomics era. *Journal of Evolutionary Biology*, 28:739–755.

Willson, M. F. (1979). Sexual selection in plants. *The American Naturalist*, 113:777–790.

Willson, M. F. (1994). Sexual selection in plants: perspective and overview. *The American Naturalist*,

144:S13–S39.

Willson, M. F. et Burley, N. (1983). *Mate choice in plants: tactics, mechanisms and consequence*. Princeton University Press, Princeton.

Wolf, J. B. et Wade, M. J. (2001). On the assignment of fitness to parents and offspring: whose fitness is it and when does it matter? *Journal of Evolutionary Biology*, 14:347–356.

Wright, J. W. et Meagher, T. R. (2003). Selection on floral characters in natural Spanish populations of Silene latifolia: Floral selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 17:382–395.

Wu, Y., Zhong, T., Zhang, Z.-Q., et Li, Q.-J. (2018). Pollinator-mediated selection on floral traits varies in space and between morphs in *Primula secundiflora*. *AoB PLANTS*, 10:ply059.

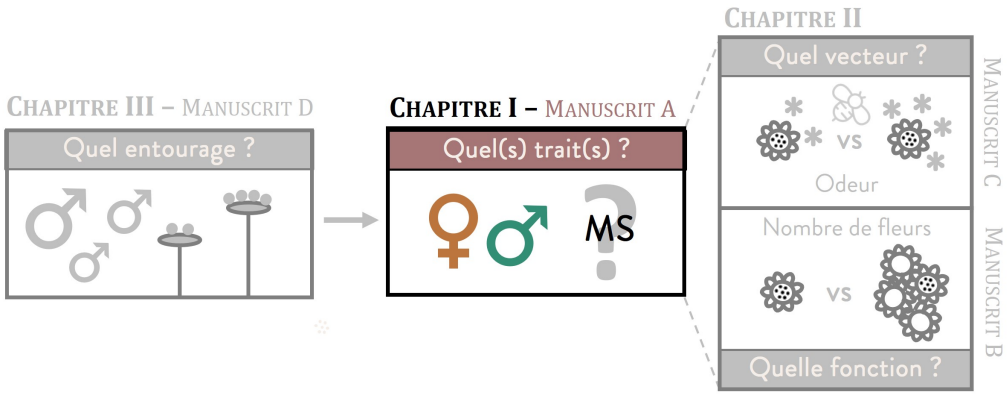
Zahavi, A. (1975). Mate selection - a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, 53:205–214.

Chapitre I

Sélections sexe-spécifiques

Résumé en français du chapitre I

La sélection naturelle sur les traits floraux peut varier entre les sexes, s'ils ne sont pas limités par les mêmes facteurs dans leur succès reproducteur (Moore & Pannell, 2011). Dans ce chapitre, les patrons de sélection naturelle sexe-spécifique sur les traits floraux sont estimés sur l'ensemble d'une saison de floraison. Par ailleurs, un estimateur de l'accès à la reproduction, le nombre de partenaires sexuels génétique, est estimé pour chacun des sexes. Cet estimateur permet de comparer directement la sélection sexuelle sur les traits floraux entre les sexes, en termes d'avantage à bénéficier de plus de partenaires sexuels. La force globale de la sélection sexuelle agissant chez chacun des sexes est par ailleurs évaluée, à l'aide du gradient de Bateman partiel (c-à-d en contrôlant dans le modèle statistique pour les traits impliqués dans la fécondité; Henshaw et al., 2018). Une dernière approche est utilisée pour évaluer les avantages des traits floraux en termes d'accès à la reproduction chez les femelles, en estimant la sélection médiée par les pollinisateurs (Sandring & Ågren, 2009). Ces méthodes complémentaires permettent ainsi de mieux comprendre les effets des traits floraux à divers niveaux dans la chaîne de reproduction. Il ressort de cette étude que la sélection sur les traits floraux chez les femelles est dirigée par la sélection de fécondité. Chez les mâles, la durée de floraison semble être un déterminant majeur du succès reproducteur, probablement en raison du lien entre ce trait et la synchronie avec les partenaires sexuels potentiels. Enfin, les résultats du gradient de Bateman coïncident avec les attendus théoriques, les mâles étant plus limités dans leur succès reproducteur par le nombre de partenaires sexuels que les femelles. Ces résultats sont discutés sous le prisme des spécificités de la reproduction des plantes à fleurs.



References

Henshaw J.M., Jennions M.D., Kruuk L.E.B. (2018). How to quantify (the response to) sexual selection on traits. *Evolution*, 72:1904–1917.

Moore J.C., Pannell J.R. (2011). Sexual selection in plants. *Current Biology*, 21:R176–R182.

Sandring S., Ågren J. (2009). Pollinator-mediated selection on floral display and flowering time in the perennial herb *Arabidopsis lyrata*. *Evolution*, 63:1292–1300.

- Manuscript A -

Natural and sexual selection in an insect-pollinated plant

Estelle Barbot[1,3], Mathilde Dufaÿ[2] and Isabelle De Cauwer[1]

Authors affiliation:
[1] Univ. Lille, CNRS, UMR 8198 - Evo-Eco-Paleo, F-59000 Lille, France
[2] CEFE, Univ Montpellier, CNRS, Univ Paul Valéry Montpellier 3, EPHE, IRD, Montpellier, France
[3] Corresponding author: Estelle Barbot, E-mail: estelle.barbot@protonmail.com

In preparation

Contents

Abstract 73
Introduction 75
Material and Methods 77
Study system 77
Experimental population 77
Experimental design 78
Common garden 78
Plant traits 78
Reproductive and mating success 79
Statistical analyses 80
Results 82
Trait variation 82
Natural selection differentials and gradients 86
Mating gradients 88
Sexual selection indexes 88
Discussion 88
Natural selection on floral traits 88
Disentangling pollinator-mediated and fertility selection in females . . 89
Sexual selection 90
Sexual dimorphism evolution 91
References 92
Supplementary materials 97

Abstract

To date, studies of sexual selection have mainly focused on animals, although competition for mate acquisition is the hallmark of any sexual organism. In insect-pollinated plants, competition to attract pollinators is expected to result in pollinator-mediated selection on attractive floral traits. This should overlap with sexual selection if the number of mating partners increases with pollinator attraction. According to Bateman's principles, competition to attract pollinators should be stronger in males, resulting in stronger sexual selection on floral traits. On the contrary, in females, traits should be mostly under fertility selection. In this study, we compared the strength of natural and sexual selection on floral traits in both males and females of *Silene dioica*, a species with separate sexes. Moreover, using hand-pollination allowed us to disentangle pollinator-mediated from fertility selection in females. Using Bateman's metrics, we found that males were under stronger sexual selection than females. Floral traits in females were neither under pollinator-mediated nor sexual selection, except flower number, in our experimental population. In contrast, flowering duration in males was under both natural and sexual selection, while potentially attractive floral traits were not. Our results shed light on the effects of sexual selection on floral traits in animal-pollinated species.

Key words: floral traits - Bateman gradient - pollinator-mediated selection - fertility selection - mating success - paternity analysis

Introduction

In sexual species, acquiring access to gametes produced by mating partners is a fundamental step of reproduction. Sexual selection (selection arising from competition for mating partners and/or their gametes), along with viability selection (selection for traits that increase survival) and fertility selection (selection for traits that increase the number of offspring per reproductive episode, e.g. via gamete production), constitute the three routes through which natural selection shapes phenotypic traits (Arnold, 1994; Delph and Herlihy, 2012). In animals, variance in mating success (generally defined as the number of sexual partners) is often explained by mechanisms occurring either during the pre-copulation phase (through competition for mating opportunities, mate attraction and/or mate choice) or during the post-copulation phase (through sperm competition and/or cryptic female choice). In mobile animal species, pre-copulatory sexual selection has often been proposed as the ultimate cause for the evolution of extravagant phenotypes in males, in a large array of traits including ornaments, armaments and behaviors (Darwin, 1871; Lande and Arnold, 1983; Jennions and Kokko, 2010). In this matter, the metrics derived from Bateman's principles allow estimating overall strength of sexual selection acting in each sex (Bateman, 1948; Arnold, 1994). These metrics are (i) the opportunity for selection I, which is the variance in reproductive success, (ii) the opportunity for sexual selection I_S, which is the variance in mating success and (iii) the Bateman gradient, which quantifies the benefit of acquiring more mates by regressing reproductive success on mating success (Jones, 2009). These complementary measurements allow testing for Bateman's principles, which stipulate that the sex with the highest variance in reproductive and mating success, and with the strongest dependency of reproductive success on mating success should be under stronger sexual selection (Jones, 2009). Using these established metrics of sexual selection, a recent meta-analysis on animal species showed that sexual selection is often stronger in males than in females (Janicke et al., 2016), which is generally interpreted as a direct consequence of anisogamy (Bateman, 1948).

Although animal species with sexual dimorphism in secondary sexual characters have been the primary focus of sexual selection theory, there is now a wide acceptance that sexual selection should occur in plants as well (Arnold and Duvall, 1994; Delph and Ashman, 2006; Moore and Pannell, 2011). Even though plants are sessile and lack the cognitive abilities to perform conscious mate choice, competition for access to reproductive partners is expected to take place both before pollination (e.g. male-male competition for access to stigmas) and after pollination (e.g. pollen competition for access to ovules; Murphy, 1998; Moore and Pannell, 2011). It is noteworthy that pollen dispersal from anthers to stigmas is mediated by animal pollinators in the vast majority of angiosperms (Ollerton et al., 2011). In most flowering plants, sexual selection thus potentially operates in a very peculiar way compared to animals, with the pre-pollination component of competition for access to mates being mediated by the behavior of another – or several other – species. Because attracting pollinators is a necessary component of mate acquisition in animal-pollinated species, pollinator-mediated selection on attractive floral traits (selection arising from competition for pollinator attraction) should at least partially overlap with sexual selection (Delph and Ashman, 2006; Waelti et al., 2009; Dai and Galloway, 2013; Paterno et al., 2020).

If one applies the framework of sexual selection to insect-pollinated plants, male reproductive success should be more dependent on pollinator attraction than female reproductive success. Indeed, there are some arguments advocating for a stronger overall sexual selection in males than in females in species with separate sexes, or through male function than female function in case of hermaphrodite

species. First, plants are anisogamous species, and males should thus be more limited by mate acquisition than females as is the case in animals without reversed sex-roles (Bateman, 1948; Willson and Burley, 1983; Janicke et al., 2016). Second, in dioecious plant species (species with separate sexes), males often have more conspicuous floral displays than females, at least in temperate regions, which could again be linked to a stronger selection on traits that are linked to pollinator attraction in that sex (Delph et al., 1996; Eckhart, 1999). Third, selection on floral traits has been documented to be stronger through male than female function in some hermaphrodite species, potentially because these traits promote pollinator attraction, although sexual selection was not directly measured in these studies (e.g. Hodgins and Barrett, 2008 for corolla width; Briscoe Runquist et al., 2017 for petal area). These observations thus seem consistent with sexual selection occurring in males, and potentially being stronger than in females, as observed in the animal kingdom (Janicke et al., 2016). Nonetheless, a major difference with animals is that female reproductive success is often limited by pollen receipt in natural populations (Knight et al., 2005), meaning that both sexual functions can be limited in their access to reproductive partners. In other words, under pollen limitation, pollinator-mediated selection should shape attractive traits through both sexual functions in hermaphroditic species, or in both sexes in dioecious species (Caruso et al., 2019). However, direct measurements of the relative strength of pollinator-mediated selection or of sexual selection in both sexes have been done only in a very limited number of plant species (Delph et al., 1996; Tonnabel et al., 2019b).

From the female perspective, one way to estimate the strength of pollinator-mediated selection is to assess the relationship between floral traits and pollen deposition (Dai and Galloway, 2013). An alternative method is to use pollen supplementations: by comparing selection gradients on traits from open-pollinated females to selection gradients on traits from hand-pollinated females (i.e. with stigmas saturated with pollen; Sletvold and Ågren, 2010; Trunschke et al., 2017), one can assess the magnitude of pollinator-mediated selection on these traits. However, because these methods focus on the female reproductive success, it does not allow any comparison between male and female reproductive functions. Moreover, this method estimates selection on traits that increase pollen receipt, without assessing the benefit of acquiring more sexual partners which could enhance offspring fitness in some cases (Pannell and Labouche, 2013).

In many animal species, access to reproduction has then been estimated as the number of genetic sexual partners, based on paternity analyses (Janicke et al., 2016). Although the number of genetic sexual partners may underestimate the actual number of mates, because it depends on both access to mates and post-fertilization processes (cryptic female choice and competition among male gametes; Anthes et al., 2016), this estimate has the clear advantage of providing an equivalent measurement of mating success in both males and females. The only study that estimated the Bateman gradient using the number of genetic sexual partners in an angiosperm species, the wind-pollinated dioecious *Mercurialis annua*, found results remarkably consistent with the general trend in animals, with mating and reproductive success being independent in females but strongly positively correlated in males (Tonnabel et al., 2019b). However, this measurement might not always reflect the number of mating opportunities in plants, in particular in insect-pollinated taxa. Indeed, because each flower constitutes a reproductive tract, mating events could be quite independent among flowers, depending on pollinators' visitation sequences. One could expect the number of genetic mating partners to increase with the number of flowers (and thus with the number of gametes) and be an indirect by product of individual fertility. By correcting this estimate of mating success by individual fertility, one should be able to compare the strength of sexual selection between males and females while minimizing this bias.

In this study, we used the dioecious insect-pollinated species *Silene dioica* to estimate sex-specific sexual selection on floral traits. Our objectives are fourfold. First, by estimating reproductive success across the whole flowering season in an open-pollinated experimental population, we will (i) quantify the effect of floral phenotype on reproductive success, which will be referred to as natural selection. In our study, this includes both sexual and fertility selection, but not viability selection as only one flowering season was considered. Estimating these natural selection gradients (i.e. regression of reproductive success on floral traits) will allow assessing sex-specific patterns by comparing selection strengths between sexes. Second, by comparing selection gradients on floral traits between open-pollinated and hand-pollinated female plants, we will (ii) quantify the relative importance of pollinator-mediated selection, as an estimator of sexual selection, versus fertility selection in females. In addition, we will (iii) use genetic mating success as an estimate of the number of mates, as classically done in animal studies. We will then estimate mating gradients (i.e. regression of mating success on traits) in both sexes, and estimate if there is sex-specific sexual selection acting on floral traits. Finally, we will (iv) use the metrics derived from Bateman's principles to compare overall sexual selection between sexes. We will estimate Bateman's gradients while controlling both for the number of flowers and the number of gametes per flower when regressing reproductive success on mating success (i.e. partial Bateman's gradient). Studying sexual selection in plants combining several approaches, including those classically used in animal studies, will provide an integrative framework to understand how sexual selection on floral traits in plants parallels with other selection components and with sexual selection in animals.

Material and Methods

Study system

Silene dioica (L.) Clairv. is a herbaceous short-lived perennial species of the Caryophyllaceae family that is widely distributed throughout most of northern and central Europe (Baker, 1947; Jalas and Suhominen, 1986) It is a dioecious species with XY sex determination (Warmke, 1946; Ming et al., 2011). The species flowers during late spring, but is known to sometimes exhibit a second flowering peak at the end of summer (Jürgens et al., 1996; Bopp and Gottsberger, 2004). In northern France, this second peak is generally brief and presents extremely male-biased sex ratios, so most of the reproduction effectively occurs during the first peak, between end-April and mid-July (pers. obs). This species presents a generalist insect-pollination system, with Bombus species and Syrphidae as main pollinators (Baker, 1947; Westerbergh and Saura, 1994). *Silene dioica* has been documented as sexually dimorphic for flower size and number (males > females; Kay et al., 1984; Baena-Díaz et al., 2019; Moquet et al., 2020), total nectar production at the flower level (females > males; Hemborg and Bond, 2005) and flowering duration (males > females; Hemborg, 1998).

Experimental population

Experimental plants were derived from seeds harvested in three forests during 2015, 2016 and 2017 (site A 50°12'05.4"N 3°44'95.7"E, site B 50°26'06.0"N 3°18'39.5"E and site C 50°23'19.3"N 3°25'24.9"E). Our experimental population thus included three cohorts (one, two and three-year-old plants). Sampling sites were geographically close to each other (i.e. maximum distance = 40 km) and to our experimental garden (< 65 km). Seeds were collected at different study sites to reach a sufficient sample size without including half or full-sibs. Plants were repotted every year in new potting mix and kept in the exact same conditions in the greenhouse until the experiment.

Experimental design

Three groups of plants placed were established in the same common garden. The three source forests and the three cohorts were evenly distributed among these groups. The two first groups were open-pollinated females (OP females hereafter, 98 individuals) and open-pollinated males (OP males, 102 individuals) that were left to be naturally pollinated by insects present in the experimental garden. In the third group, composed of hand-pollinated females (HP females, 65 individuals), all open flowers were supplemented three times a week with pollen from a pool of 65 males from the same collection and kept in a greenhouse. For a given HP female and a given supplementation day, dehiscent anthers were collected on two randomly selected pollen donors and were brushed on the stigmas.

Common garden

The experimental population was set up in a common garden in April 2018 on the campus of Lille University in France (50°36'32.7"N 3°08'40.3"E) during spring 2018. No wild populations of *Silene dioica* were growing in the vicinity. All individuals were in separate 0.7-L pots filled with a standard soil mixture. Plants were watered every other day, or every day on the hottest days. The surface areas of the two experimental plots (i.e. one for OP plants and one for HP females, separated by 1.5 meter) were kept constant throughout the flowering season. Because of inter-individual variance in flowering phenology, the density of flowering plants changed across time (from 2 to 12 individuals per m^2). OP females and males were spatially alternated following a grid pattern. Each week, the spatial position of individuals within each plot was randomized while keeping the male-female alternation.

Plant traits

A total of 19 traits were measured on all plants from the three experimental groups.

Flowering phenology - Flowering phenology was described with two traits: the date of first flowering and flowering duration, measured as the number of weeks during which at least one flower was open for a given individual.

Number of gametes per flower - In females, the number of ovules per flower was estimated at the end of the survey, by dissecting a subsample of fruits per plant. Fruits were collected at maturity, typically two to three weeks after flower opening. At the end of the flowering season, 1004 fruits (one fifth of total fruit production) were randomly chosen and dissected to estimate ovule and seed production for each female (6 and 44 fruit per female, with the number reflecting the females' contribution to the overall fruit production at the population level). Unfertilized ovules and seeds were counted by imaging the fruit content using a high resolution scanner (Epson Perfection V700 Photo, Seiko Epson, Suwa, Japan) and using digital image processing (EBImage package in R; Pau et al., 2010). Unfertilized ovules and seeds were distinguished on the basis of size (0.062 ± 0.031 mm^2 for unfertilized ovules vs 0.86 ± 0.12 mm^2 for seeds). The number of unfertilized ovules and seeds were then summed within each fruit and averaged over all fruits imaged for each OP and HP female, yielding an estimate of female gamete production per flower.

In males, the number of viable pollen grains per flower was assessed on one nearly open bud at the flowering peak (i.e. the date where population-level flower production was maximal). This measurement involved multiplying the proportion of viable pollen grains by the pollen quantity per flower. To do so, each bud was dissected to keep three of the ten anthers. Pollen was removed from the first one and placed on a glass slide with one drop of staining solution to assess the proportion of viable pollen grains under x100 microscope (Peterson et al., 2010). The two remaining anthers were used to

estimate pollen quantity per flower using a particle counter (CASY® Model TT, Roche Innovatis AG, Bielefeld, Germany) and following the protocol described in Dufaÿ et al. (2008).

Floral traits - The remaining 16 traits fall in three categories: (i) non-invasive measurements, performed weekly, (ii) measurements involving the removal and dissection of a flower that were only conducted once, at the flowering peak and (iii) measurements performed at the end of the flowering season.

Weekly measurements - Daily flower number (i.e. number of flowers open on a given day), stem number (i.e. number of branches with at least one open flower), height of the highest open flower (cm), as well as corolla width (mm) and calyx height (mm, measured on two randomly chosen flowers using a digital calliper precise to 0.01 mm and averaged), were surveyed once a week. All these repeated measured traits showed Gaussian distribution, and were thus summarized using mean except maximum for plant height.

Measurements at the flowering peak - On the evening before measurements, all mature flower buds were marked using watercolor paint, and individuals were isolated under an insect-proof tent in order to exclude nectar feeding pollinators. The next day, one newly opened flower was randomly selected among the marked ones. On this flower, we estimated the total volume of nectar using 2µL microcapillary tubes. Nectar sugar content (µg of sucrose equivalent per flower) was then determined using a refractometer (Abbe NAR-1T LIQUID, Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan). On the same flower, one freshly dissected petal was used to measure reflected light on average every 0.6 nm within 200-700 nm using a probe connected to an AvaLight-XE ULS2048 spectrometer and to an AvaLight-XE xenon pulsed light source (Avantes, Apeldoorn, the Netherlands). Spectra were calibrated against a fully absorbing black standard and a fully reflecting barium sulfate white standard. Two measures were performed for each individual, one on each petal lobe. Averaged reflectance spectra were analyzed using the pavo package in R (Maia et al., 2019). As in Cuthill et al. (1999), the dimensionality of the spectra was reduced using Principal Component Analysis on centered spectra. The first three principal components explained 97% of variation in our data set and were kept as color descriptors. Finally, to characterize petal size, area and shape, another petal was dissected on each collected flower, taped flat and imaged using a high resolution scanner (Epson Perfection V700 Photo, Seiko Epson, Suwa, Japan). Using ImageJ (Schneider et al., 2012), we then measured petal length from the paracorolla to the apical part (mm), largest width (mm), cleft length (mm) and petal area (mm^2). Two indexes of petal shape were then calculated: elongation (i.e. length divided by width) and bifidity (i.e. cleft length divided by length).

Measurements at the end of the flowering peak - At the end of the flowering season, the total production of flowers was estimated on both males and females by counting all pedicels attached on the stems.

Reproductive and mating success

Females - Seed number per fruit was estimated jointly with ovule number (see above). Female reproductive success was then estimated by multiplying mean seed number per fruit, total number of fruits and germination rate. Germination rates were estimated on a sub-sample of seeds (15 to 90 seeds per female according to its relative production) that were sown in petri dishes filled with 40mL of 10g/L agar in sterile water (photoperiod 14:10 and temperature 15-21°C).

Males – Reproductive success was estimated by genotyping a subsample of seedlings and performing a paternity analysis. Genotyped seedlings were selected so as to (i) reflect each females's contribution

to the total seed pool and (ii) maximize the number of different fruits per female.

Total genomic DNA of all adults (200 OP plants) and 2916 seedlings was extracted from 10-15 mg of dried leaves using the Chemagic DNA Plant Kit (Perkin Elmer Chemagen, Baesweller, DE) and an automated DNA purification workstation (KingFisher®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) following the protocol described in Holtz et al. (2016). Single-step multiplex PCR assays were used to amplify five nuclear microsatellites (Table SA1). The PCR cycling program was as follows: (i) an initial denaturation phase of 95°C for 15 min, (ii) an amplification phase of 32 cycles of 94°C for 30 s, annealing temperature of 55°C for 1 min 30 s and 72°C for 1 min and (iii) a final extension phase at 60°C for 30 min. Electrophoresis was conducted on a capillary sequencer (Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer). Alleles were called using GeneMapper® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Paternity assignments were conducted using the maximum-likelihood procedure implemented in the software CERVUS v.3.0.7 (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007). Likelihood scores, based on allele frequencies in the experimental population, were calculated for each seedling / potential father couple. To determine whether the paternity of each offspring could be assigned to the father with the highest likelihood, we used the difference in likelihood scores between the two most likely pollen donors (ΔLOD). The critical value (ΔC) of ΔLOD below which paternity could not be assigned at 80% was determined using a distribution of Δ obtained from 10 000 simulated pollination events. This distribution was generated using the following simulation parameters: no unsampled pollen donors and 2% of genotyping error. The reproductive success of each male was estimated as the number of genotyped seedlings fathered.

We also used the results from the paternity analysis to estimate the genetic mating success of each OP female and male as the number of effective mating partners per individual.

Statistical analyses

All analyses were conducted in R (Team, 2019).

Trait variation – Within each of the three experimental groups (HP females, OP females and males), correlations between all 19 measured traits were investigated to explore the phenotypic architecture and to identify trade-offs between reproductive traits. Correlations were calculated using the Pearson correlation coefficient and significance was assessed using a t-test with Bonferroni correction. Additionally, phenotypic variation between groups was tested for all floral traits using type II ANOVAs with a fix effect of group, and random effects of cohort and source forest, in order to (i) verify homogeneity between OP and HP females and (ii) assess the occurrence of sexual dimorphism between OP females and males.

Pollen limitation – The occurrence of pollen limitation was tested on three components of overall female reproductive success by assessing differences between OP and HP females in (i) seed-set (i.e. seed number divided by ovule number over all dissected fruits), (ii) fruit-set (i.e. total fruit number divided by total flower number) and (iii) total number of seeds. Differences in seed-set and fruit-set between OP and HP females were assessed using generalized linear models with binomial distribution. Differences in total seed production were assessed by using a generalized linear model with Poisson distribution. Type II ANOVAs with a fixed effect of group, and random effects of cohort and source forest, were used to test the effect of pollination treatment.

Standardization - All floral traits were centered-scaled within groups to allow comparison by removing dimension (i.e. variance(SD)- standardized selection gradient; Lande and Arnold, 1983; Matsumura et al., 2012. As males and females differ in some of their traits' variances, we also estimated mean-standardized selection gradient in order to assess the change in relative reproductive or mating success for a proportional change in trait (Hereford et al., 2004; Houle et al., 2011). Female and male reproductive success were relativized within groups by dividing the absolute reproductive success for each individual by group mean. Mating success was estimated in OP females and males only and were relativized within sex. Cohort and source forest were both added as random factors in the models described below.

Natural selection differentials and natural selection gradients – For each measured trait, we estimated the selection differential as the slope of the simple linear regression of reproductive success on trait values. Selection differentials represent total selection, which includes both direct selection (trait with direct effect on reproductive success, all else being equal) and/or indirect selection via correlations with other traits. The effect of traits on reproductive success was assessed using univariate models and type II ANOVA.

We also estimated direct natural selection on phenotypic traits by taking into account covariances between a subset of traits. To do so, we estimated selection gradients using multiple linear regression models, as described in Lande and Arnold (1983). The data set was simplified by reducing the number of traits because (i) our statistical power was limited due to sample size and (ii) multicollinearity is known to produce unstable selection gradient estimates (Thompson et al., 2017). We selected nine traits in order to keep a data set with limited correlations and to cover different functional categories: two traits that are presumably involved in long distance attraction (plant height, daily flower number), three flower morphology traits that are expected to impact both attraction and various aspects of the plant-pollinator fit (corolla width, calyx height and petal elongation), one color trait (the first principal component of the PCA on color spectra), one reward trait (nectar sugar content), one trait linked with phenology (flowering duration), as well as one descriptor of plant fertility (number of gametes per flower).

Multiple linear regressions of reproductive success on the nine selected floral traits were performed (i) group by group, (ii) on a dataset grouping HP and OP females, allowing us to test for the occurrence of pollinator-mediated selection and (iii) on a dataset grouping OP females and males, allowing us to test for sex-specific selection. Type III ANCOVA was used to test the effect of the group $\times$ trait interaction.

Sexual selection gradients and indexes – We estimated mating gradients (i.e. direct sexual selection), by regressing mating success in OP females and males on the nine traits, using the same method as for natural selection gradients. Type III ANCOVA was used to test the sex $\times$ trait interaction.

Additionally, we used Bateman's three metrics to quantify the overall strength of sexual selection in each sex. First, we estimated the standardized variance in reproductive success, which corresponds to the opportunity for selection I (Wade, 1979). Second, we estimated the standardized variance in mating success in each sex, which corresponds to the opportunity for sexual selection I_S (Wade, 1979; Wade and Arnold, 1980). We tested difference in reproductive and mating success variances between sexes using Levene tests. Third, we estimated a standardized partial Bateman gradient in each sex, by assessing the slope of a linear regression of relative reproductive success on relative mating success, while controlling for total flower number and mean number of gametes per flower (Henshaw

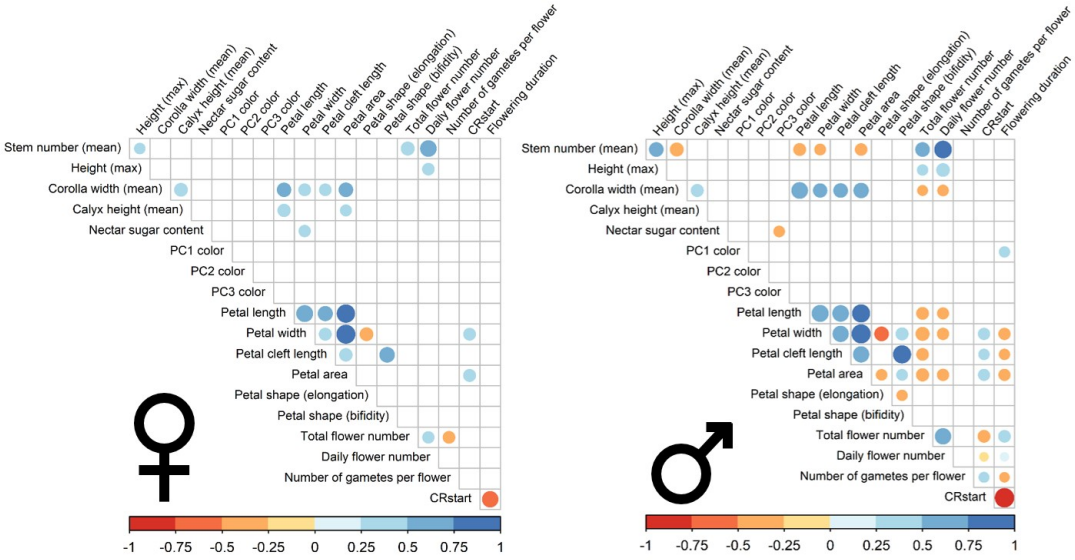


Figure 1: Correlations between traits for OP females (left) and OP males (right). Correlation coefficients that were statistically significant after Bonferroni correction are colored, with positive correlations in blue and negative correlations in red. The size of the dot is proportional to the correlation coefficient value. Correlations between (i) petal measures and (ii) petal composite indexes (i.e. petal shape) are not relevant. Exact values for the coefficients are available in supplementary materials (Table SA2).

et al., 2018). We then tested for significance in each sex with type II ANOVA. We also tested for the differences in the Bateman gradient between sexes by using type III ANCOVA to test for mating success × sex interaction.

Results

All repeated measures (i.e. weekly measurements and petal color) were checked for repeatability, and showed higher variation among than within individuals (data not shown). All linear models verified (i) normal distribution of residuals, (ii) homoscedasticity and (iii) low levels of multicollinearity (i.e. variance inflation factor smaller than 4; Thompson et al., 2017). Generalized linear models with Poisson distribution did not show overdispersion.

Trait variation

Correlations between traits in open pollinated plants - Within each sex, correlations between traits were explored for all possible pairs (171 pairs). Overall, males appeared to be more phenotypically integrated than females (29.2% vs 14.6% of all correlations were significant after Bonferroni correction; Figure 1; Table SA2). In females, significant correlations were mostly positive (22 out of 25 significant correlations), while nearly half of them were negative in males (24 out of 51 significant correlations). Some obvious correlations were observed in both males and females, such as positive correlations between various measurements of flower size (corolla width, calix height, petal length, width and area) or positive correlation between stem number, flower number (both daily and total) and height (Figure 1; Table SA2). The most notable differences between males and females included (i) a positive correlation between estimates of flower number and flowering duration in males only, (ii)

Table 1: Trait mean ± SD in each of the three experimental groups.

Traits	**OP females**	**OP males**	F_{sex}	P_{sex}
Stem number (mean)	1.09 ± 0.45	5.81 ± 3.07	357.0	**<0.001**
Height (cm, max)	47.03 ± 14.68	53.31 ± 12.86	14.7	**<0.001**
Corolla width (mm, mean)	17.93 ± 2.65	20.05 ± 1.87	48.2	**<0.001**
Calyx height (mm, mean)	13.44 ± 1.01	15.66 ± 1.01	241.7	**<0.001**
Nectar sugar content (μg sucrose/flower)	0.71 ± 0.57	0.46 ± 0.3	10.0	**<.01**
PC1 petal color	-0.09 ± 3.69	-0.17 ± 3.22	0.12	0.73
PC2 petal color	-0.08 ± 2.93	0.03 ± 2.52	0.23	0.63
PC3 petal color	-0.04 ± 1.14	-0.07 ± 1.06	0.27	0.61
Petal length (mm)	8.81 ± 1.24	9.23 ± 1.21	7.5	**<.01**
Petal width (mm)	9.02 ± 1.38	9.94 ± 1.51	21.8	**<.001**
Petal cleft length (mm)	4.1 ± 0.67	4.71 ± 1.13	22.8	**<.001**
Petal area (mm^2)	56.72 ± 15.4	63.52 ± 15.85	11.4	**<.01**
Petal shape (elongation)	0.98 ± 0.1	0.94 ± 0.11	9.0	**<.01**
Petal shape (bifidity)	0.47 ± 0.06	0.51 ± 0.09	11.4	**<.01**
Total number of flowers	30.32 ± 11.84	316.32 ± 150	426.9	**<.001**
Daily flower number (mean)	2.51 ± 1.12	18.59 ± 8.52	494.3	**<.001**
Number of gametes per flower	257.71 ± 46.02	37123.1 ± 17633.12	426.9	**<.001**
Flowering start	4.77 ± 1.79	5.16 ± 1.64	5.5	**0.019**
Flowering duration (weeks number)	4.3 ± 1.47	6.79 ± 1.56	136.2	**<.001**

Note: Variation in traits is showed for open-pollinated (OP) females and OP males. F_{sex} and P_{sex} are respectively F-statistic and P-value for differences between OP females and OP males. Values in bold are significant at $P < .05$. Error degrees of freedom for repeated measures, phenology measures and total number of flowers are 194. Error degrees of freedom for measures at the flowering peak are 165 (except for nectar sugar content and PCs petal color, 159).

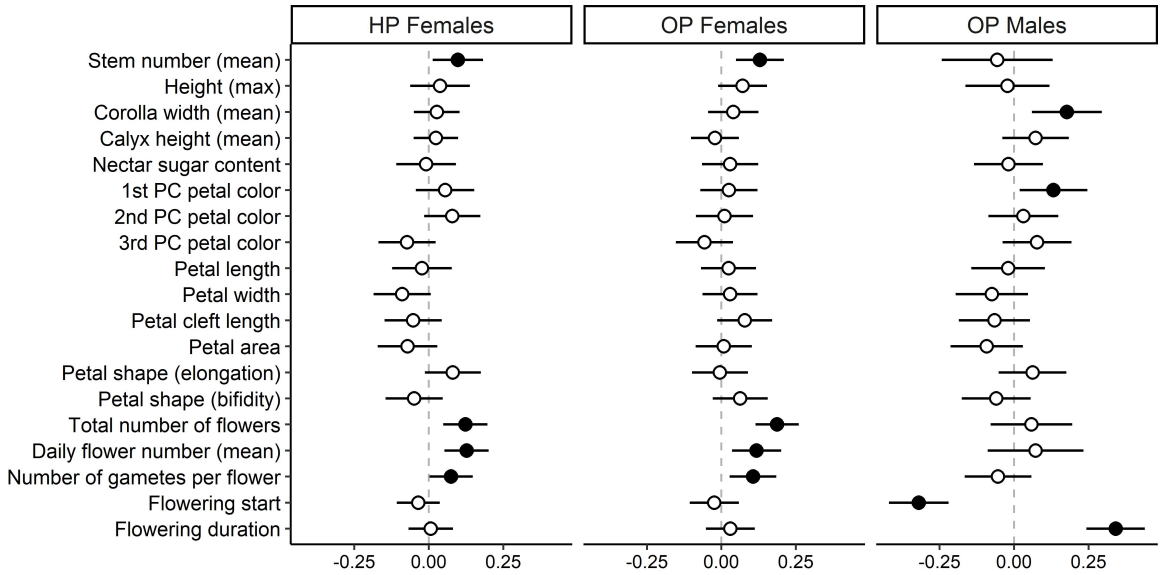


Figure 2: Total natural selection on traits for each group of plants. Selection differentials (+95% CI) from simple linear regression models on relative fitness and standardized traits are reported, with significant selection differentials in black and non-significant ones in white.

a trade-off between flower size and total flower number, as well as between flower size and flowering duration, in males only and (iii) a negative correlation between the number of gametes per flower and total flower number in females, whereas viable pollen production per flower was negatively correlated with flowering duration in males. Regarding color spectra, the first three axes of PCA analysis on reflectance explained respectively 54%, 37% and 6% of total variance. PC1, which is classically linked to variation in luminance (Renoult et al. 2013; Kemp et al. 2015), as was the case in our data set ($r_{200} = -0.94$, $P < .001$, data not shown), was positively correlated with flowering duration in males but not in females. PC2, which was linked to color saturation ($r_{200} = -0.92$, $P < .001$, data not shown), did not correlated with any other traits in both sexes. PC3, which was linked to the reflectance in UV wavelengths ($r_{200} = -0.65$, $P < .001$, data not shown), is negatively correlated to nectar sugar content in males.

Homogeneity between open-pollinated and hand-pollinated females - We detected no significant differences in traits between the two groups of females, except for two traits. HP females displayed fewer flowers per day ($F_{1,1,1,158} = 4.3$, $P = .039$) and shorter calyxes ($F_{1,1,1,158} = 5.4$, $P = .041$) than OP females.

Sexual dimorphism – All measured traits were sexually dimorphic, except for the three principal components of the PCA on petal color spectra (Table 1). Males produced more flowers, both daily and total, flowered longer, were taller and produced larger flowers, both in terms of corolla width and calyx height, than females. The same was true for all petal measurements. Males also had more elongated and bifid petals. The only trait showing female-biased sexual dimorphism was nectar sugar content, with females offering significantly more reward per flower than males. However, because of the difference in flower production between sexes, nectar reward at the plant level was still overwhelmingly more abundant in males than in females.

Table 2: Direct natural selection on traits.

	β HP females $R^2_M = 0.297$	P	β OP females $R^2_M = 0.256$	P	β OP males $R^2_M = 0.302$	P	γ_{pol} $R^2_M = 0.064$	P_{pol}	γ_{sex} $R^2_M = 0.195$	P_{sex}
Height (max)	-0.020 ± 0.073	.79	0.014 ± 0.052	.79	0.079 ± 0.076	.30	-0.0024 ± 0.10	.98	0.066 ± 0.093	0.48
Corolla width (mean)	0.056 ± 0.082	.49	0.011 ± 0.056	.84	0.12 ± 0.063	.062	0.071 ± 0.12	.54	0.14 ± 0.085	0.11
Calyx height (mean)	-0.040 ± 0.066	.54	-0.067 ± 0.052	.19	-0.071 ± 0.059	.23	0.012 ± 0.096	.90	-0.032 ± 0.082	0.70
Nectar sugar content	0.036 ± 0.062	.56	0.027 ± 0.045	.55	-0.039 ± 0.054	.47	0.027 ± 0.089	.76	-0.050 ± 0.072	0.49
PC1 petal color	0.0033 ± 0.064	.96	0.059 ± 0.046	.19	0.011 ± 0.062	.86	-0.047 ± 0.091	.61	-0.055 ± 0.079	0.49
Petal shape (elongation)	0.11 ± 0.070	.12	0.0065 ± 0.047	.89	0.036 ± 0.058	.53	0.092 ± 0.10	.36	0.034 ± 0.076	0.66
Daily flower number (mean)	0.18 ± 0.076	**.017**	0.19 ± 0.056	**<.01**	-0.045 ± 0.080	.57	-0.012 ± 0.11	.91	-0.23 ± 0.099	**0.022**
Number of gametes per flower	0.13 ± 0.061	**.035**	0.15 ± 0.051	**<.01**	0.026 ± 0.057	.65	-0.0083 ± 0.091	.93	-0.11 ± 0.079	0.16
Flowering duration	0.099 ± 0.069	.15	0.082 ± 0.058	.15	0.34 ± 0.072	**<.001**	-0.027 ± 0.10	.79	0.23 ± 0.094	**0.014**

Note: Natural gradients estimation ± SE for each group of plants are reported. The interaction term γ is reported for our two main questions: (i) between pollination group and trait γ_{pol} (OP vs HP females) to investigate pollinator-mediated selection and (ii) between sex and trait γ_{sex} (OP females vs OP males) to investigate sex-specific selection. The proportion of variance explained by fixed effects in each model is reported using marginal R-squared (R^2_M). Values in bold are significant at $P < .05$.

Table 3: Direct sexual selection on traits.

	β_{MS} OP females $R^2_M = 0.143$	P	β_{MS} OP males $R^2_M = 0.386$	P	γ_{sex} $R^2_M = 0.290$	P_{sex}
Height (max)	-0.0085 ± 0.047	.86	0.046 ± 0.059	.44	0.058 ± 0.076	.48
Corolla width (mean)	0.021 ± 0.048	.67	0.095 ± 0.049	.055	0.080 ± 0.069	.24
Calyx height (mean)	-0.041 ± 0.046	.38	-0.056 ± 0.046	.22	-0.019 ± 0.066	.77
Nectar sugar content	0.041 ± 0.040	.31	-0.044 ± 0.041	.28	-0.083 ± 0.059	.16
PC1 petal color	-0.0015 ± 0.041	.97	0.050 ± 0.048	.29	0.053 ± 0.064	.41
Petal shape (roundness)	0.061 ± 0.042	.14	0.028 ± 0.044	.52	-0.031 ± 0.062	.61
Daily flower number (mean)	0.10 ± 0.049	**.039**	-0.093 ± 0.062	.14	-0.19 ± 0.080	**.016**
Number of gametes per flower	0.070 ± 0.045	.12	0.020 ± 0.044	.64	-0.046 ± 0.064	.47
Flowering duration	0.079 ± 0.051	.12	0.254 ± 0.056	**<.001**	0.17 ± 0.077	**.026**

Note: Sexual gradients estimation ± SE for OP females and OP males are reported. The estimation of the interaction term γ_{sex} between sex (OP females vs OP males) and trait is reported to investigate sex-specific sexual selection. The proportion of variance explained by fixed effects in each model is reported using marginal R-squared (R^2_M).Values in bold are significant at $P < .05$.

Natural selection differentials and gradients

Natural selection strength and direction were estimated using both (i) selection differentials (i.e. simple regressions of each trait on reproductive success, which provides a measurement of total selection on each trait, including direct and/or indirect selection; Figure 2) and (ii) selection gradients (i.e. partial regressions of each trait on reproductive success when several traits are tested together, which provides a measurement of direct selection on each trait; Table 2). Results using mean-standardization on traits to estimate selection are reported in supplementary, and are consistent with results from variance-standardization presented here (Text SB1; Tables SB1 to SB3).

Hand-Pollinated and Open-Pollinated females – Selection differentials and selection gradients were similar in the two groups of females. Selection differentials for total flower number, daily flower number, stem number and number of gametes per flower were all significantly positive, indicating that these traits are under total selection (Figure 2). When using the multi-trait model, selection gradients for daily flower number and number of gametes per flower remained significantly positive, indicating that these traits are likely to be under direct selection in females (Table 2).

Males – Positive total selection was detected for corolla width and flowering duration (negative for flowering start). We also detected positive total selection on the first component of the PCA on color spectra, with selection favoring less luminant petals (Figure 2). Regarding direct selection, the selection gradient for flowering duration remained significantly positive, while the selection gradient for corolla width was only marginally significant, and selection on petal luminance did no longer hold (Table 2).

Pollen limitation and pollinator-mediated direct selection in females – OP females produced an average of 29.4 (SD ± 11.8) fruits and 4762.6 (SD ± 1835.2) seeds, and HP females produced 26.3 (SD ± 9.6) fruits and 4336.1 (SD ± 1502.2) seeds. None of the components of female reproductive success indicated pollen limitation (GLMs, seed-set: $\chi^2_{1,1,1,158} = 2.79, P = .095$; fruit-set: $\chi^2_{1,1,1,158} = 0.46, P = .50$; total production of viable seeds: $\chi^2_{1,1,1,158} = 2.59, P = .11$). As expected, because there was no pollen limitation, we did not observe any pollinator-mediated selection (i.e. none of the group × trait interaction were significant; Table 2). Direct selection on daily flower number and number of gametes per flower was thus acting with the same strength and same direction in HP and OP females.

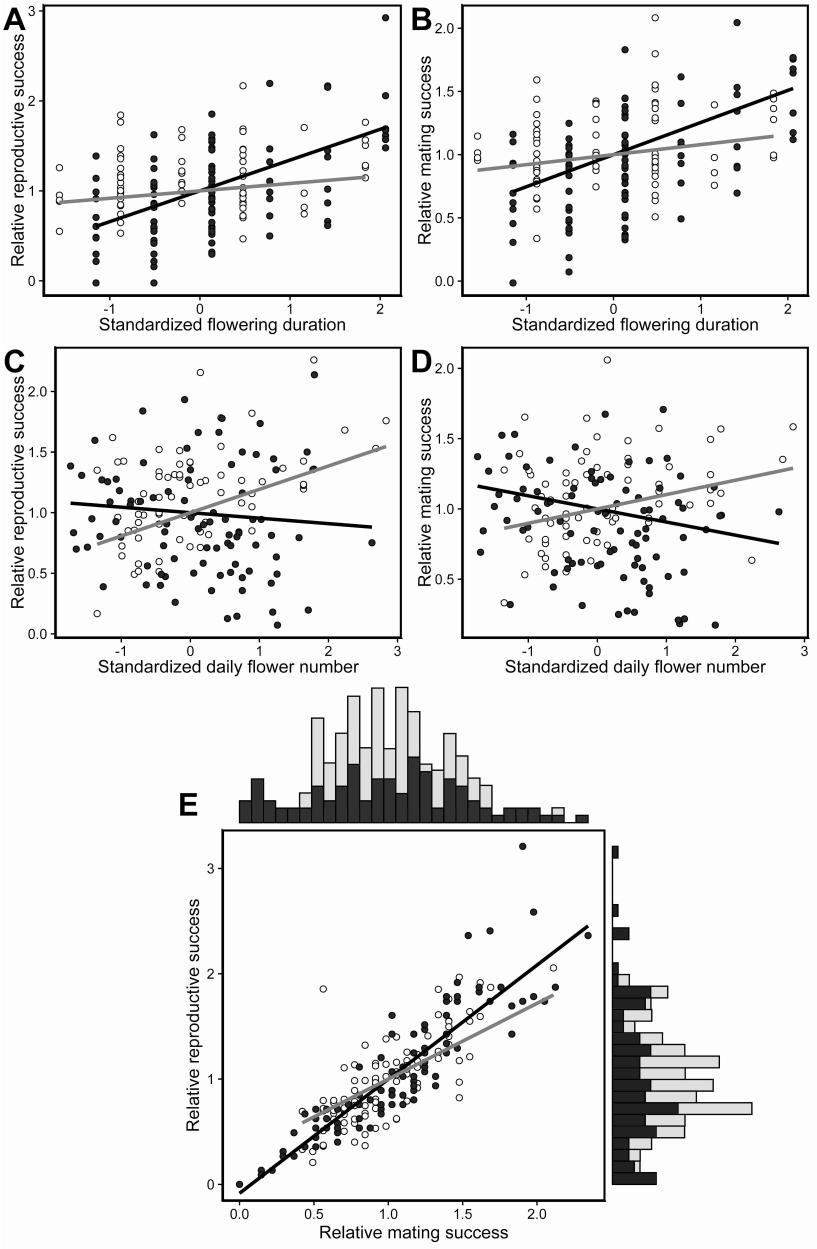


Figure 3: Sex-specific natural and sexual selection on traits, and Bateman gradient. Direct natural selection gradient estimated on (A) flowering duration and (C) daily flower number. Direct sexual selection gradient estimated on (B) flowering duration and (D) daily flower number. Plots (A-D) are added-variable plots in order to represent only the effect of the focal trait on reproductive success while controlling for the other traits in the multiple linear regression model. Bateman gradient as the regression on reproductive success on mating success (E). OP females are represented with gray line and empty circles and OP males are represented with black line and filled circles. Value frequencies for reproductive success (right) and mating success (top) are represented over margins of the Bateman gradient, with females in gray and males in black.

Sex-specific direct selection – Selection for flowering duration was stronger in OP males than in OP females (i.e. significant effect of the sex × trait interaction; Table 2; Figure 3A). On the contrary, selection on daily flower number was stronger in females than in males (Figure 3C).

Mating gradients

We detected positive sexual selection on daily flower number in OP females and positive sexual selection on flowering duration in males (Table 3). Positive sexual selection on corolla width was marginally significant in males. The sex × group interaction was significant for flowering duration, with male flowering duration being under stronger sexual selection than female flowering duration (Figure 3B) and for daily flower number, with stronger sexual selection in females (Table 3; Figure 3D).

Sexual selection indexes

The opportunity for selection I (i.e. standardized variance in reproductive success) was stronger for OP males than for OP females (0.410 versus 0.167). The opportunity for sexual selection I_S (i.e. standardized variance in mating success) was stronger for OP males than for OP females (0.249 versus 0.111). Levene's test on the variances in reproductive and mating success showed significant differences between sexes ($F_{1,198} = 169.55, P < .001; F_{1,195} = 11.9, P < .001$; Figure SA1). The partial Bateman gradient was positive both in OP females (0.72 SE ± 0.085, $P < .001$) and in OP males (1.083 SE ± 0.054, $P < .001$). The interaction term for the Bateman gradient was significant (0.36 SE ± 0.097, $P < .001$; Figure 3E), with reproductive success being more correlated with mating success in males than in females.

Discussion

Floral traits often display male-biased sexual dimorphism in dioecious plant species, which has been interpreted as the possible outcome of sexual selection (Moore and Pannell, 2011; Barrett and Hough, 2012). Because many floral traits affect pollinator attraction, the expression of more conspicuous phenotypes in males may indeed result from stronger selection on traits that increase access to mating partners (Delph, 1999; Eckhart, 1999). Our study aimed at investigating this question in a sexually dimorphic species, by comparing both natural and sexual selection gradients between males and females. In addition, maximizing access to male gametes provides an additional way of investigating sexual selection by allowing us to disentangle fertility and pollinator-mediated selection acting on female traits.

Natural selection on floral traits

Our study revealed evidence for sex-specific selection on floral traits. Selection on petal color occured in males only, suggesting selection for more luminant petals in males. It is necessary to be careful with interpretations of principal components, as it does not necessarily reflect pollinator's vision (Kemp et al., 2015). Nonetheless, luminance is perceived by both honeybees and flies, and by conservatism we could expect that Bombus species and Syrphidae, the main pollinators of *Silene dioica*, also perceived it (Osorio and Vorobyev, 2005). In any case, the fact that PC1 color was under total, but not direct selection could be explained by a phenotypic correlation between this trait and flowering duration. Total selection on corolla width also occurred in males only, although this trait was only under marginal direct selection, suggesting relatively weak selection on the trait itself. It seems plausible that selection on corolla width is due to its effect on pollinator fit and/or pollinator attraction

(as suggested by marginally positive mating gradient as well), leading to higher visitation rates and pollen removal (Conner and Rush, 1996; Ashman and Diefenderfer, 2001).

We also detected a strong positive direct selection on flowering duration in males. Total selection for an earlier flowering start was also found in our study, which is consistent with the strong correlation between these two traits. This advantage of an early flowering start in terms of siring success has already been reported in several species (e.g. O'Connell and Johnston, 1998; Austen and Weis, 2016), including a wind-pollinated species (De Cauwer et al., 2012). An earlier start and a longer flowering duration are likely to increase the overlap with receptive females, as already suggested in *Silene latifolia* by Delph and Herlihy (2012). Our findings about selection on flowering duration in male *Silene dioica* also parallel those of a recent study on *Mercurialis annua*, a dioecious wind-pollinated species, which showed a positive selection on vegetative morphologies : males with flowers placed higher up benefited from an increase in pollen dispersal distances and "spatial access" to females (Tonnabel et al., 2019a). In our case, longer flowering duration is likely to increase male reproductive success through an increased "temporal access" to mates (as confirmed by sexual selection gradients, see below).

While female reproductive success was strongly linked to flower production (both daily and total), this pattern was not seen in males. This is quite surprising since daily flower number has been shown to be involved in pollinator attraction in many plant species (Conner and Rush, 1996; Vaughton and Ramsey, 1998), including *S. dioica* (pers. obs.). Additionally, total flower number carried by males should impact their overall pollen production. Flower number has historically been considered as a typical 'male trait', based on the fact that many hermaphroditic species exhibit more flowers than the number of fruits they produce, leading to the idea that these excess flowers would have a male, rather than a female function (reviewed in Burd and Callahan, 2000). This view has however been challenged by several experimental studies that found no or even negative selection through male function on this trait (Elle and Meagher, 2000; Hodgins and Barrett, 2008; Lau et al., 2008; van Kleunen and Burczyk, 2008). The main explanation was that pollinators attracted by large floral displays might generally visit multiple flowers on each individual, leading to higher rates of geitonogamy and a possible reduction in pollen export in hermaphroditic self-compatible species (Elle and Meagher, 2000; Hodgins and Barrett, 2008; Lau et al., 2008; van Kleunen and Burczyk, 2008). In dioecious species, long visiting sequences within the same individual could decrease the efficiency of pollen export if pollen loss occurs.

Disentangling pollinator-mediated and fertility selection in females

Flower number and number of gametes per flower, were under both total and direct positive selection, with the same intensity in the two groups of females. In other words, no pollinator-mediated selection was detected and the significant selection on daily flower number and gamete number could be entirely attributed to the variance in fertility among females, rather than variance in the ability to attract pollinators. Positive selection on daily flower number through female function is a common pattern in flowering plants (Harder and Johnson, 2009). Ovule number per flower was also under positive selection in a previous study in the sister species Silene latifolia (Delph and Herlihy, 2012).

Importantly, the absence of pollinator mediated selection observed in our experiment would only be representative of populations experiencing similar ecological conditions. The density in flowering individuals set up in our experimental population was equivalent to what can be found in natural populations of *Silene dioica* (Barbot et al., in prep. D), and one study found no pollen limitation

in one wild population (Carlsson-Granér et al., 1998). However, because pollinator availability likely varies among sites, in particular in the current context of pollinator decline (Biesmeijer, 2006; Potts et al., 2010), we may expect some variation in the degree of pollen limitation in the wild (Farwig et al., 2009; Pfister et al., 2018). Under pollen limitation, pollinator-mediated selection might favor some attractive traits in females, albeit it is difficult to predict which ones would be involved (Thomann et al., 2013). Future studies, based on experimental manipulation of pollinator availability, or on estimation of selection gradients in natural populations across a gradient of pollinator abundances constitute promising avenues for future work that would allow predicting whether and how selection on floral traits should be affected by anthropogenic change.

Sexual selection

Consistently with the comparison of selection gradients between hand-pollinated and open-pollinated females, regression of mating success on floral traits revealed no evidence of sexual selection in females. On the contrary, in males, patterns of natural and sexual selection were consistent, with both types of selection acting strongly on flowering duration but only marginally on corolla width. Sexual selection seems to favor longer flowering durations because males that spread their reproductive effort over longer periods increase mate acquisition.

In addition to testing the dependency of mating success on floral phenotypes, sexual selection was also quantified using several indexes that are typically used in animals (Klug et al., 2010; Janicke et al., 2016). We found a greater opportunity for selection and sexual selection in males, consistent with the general pattern observed in animals (Janicke et al., 2016) and with the results recently reported in the wind-pollinated species *Mercurialis annua* (Tonnabel et al., 2019b). We also found a steeper Bateman gradient for males than for females, as predicted by theory (Arnold, 1994; Henshaw et al., 2018), and as found in *M. annua* (Tonnabel et al., 2019b) and in a bryophyte species *Sphagnum macrophyllum* (Johnson and Shaw, 2016). Although using genetic mating success may have biased our results (genetic mating success is sensitive to correlation with reproductive success, as only successful siring events are detected; Anthes et al., 2016), the fact that this limitation apply to both sexes suggests that the link between reproductive and mating success differed between males and females in our experiment, as predicted by the general framework of sexual selection.

Because the Bateman gradient is a correlation between reproductive and mating success, it does not allow any inference of causality. However, it is classically interpreted as the reproductive success being more (in males) or less (in females) limited by mating success. One may question such interpretation, in particular regarding females of an insect-pollinated plant species such as *S. dioica*. Indeed, because females produce several flowers, spread across their flowering season, maximized seed production should be elicited by several pollinator visits, each possibly bringing pollen grains from a specific combination of males. Therefore, if both reproductive and mating success are positively linked to flower and ovule production, this should lead to a positive Bateman gradient, even without any advantage of having several sexual partners in terms of reproductive success, as also suggested in Ketterson et al. (1998). In our study, Bateman's gradient remained significantly positive (although weaker) when using flower and gamete number as covariables in the analysis, possibly indicating an advantage of getting more sexual partners. If accessing more mates increased the probability of having mates with higher genetic quality, those ones could fecund more ovules and this would translate in a higher reproductive success (Aizen and Harder, 2007). In our study, the fact that we hand-pollinated females with only two pollen donors precludes us from disentangling the effects of pollen quantity versus diversity on female reproductive success.

Overall, our results thus support stronger sexual selection in males compared to females, based on (i) the occurrence of significant mating gradients in males only, (ii) the greater opportunity for sexual selection in males and (iii) the steeper Bateman gradient in males. This confirms the general prediction that sexual selection mainly occurs in males when the pollination context is favorable.

Sexual dimorphism evolution

With the exception of nectar sugar content and petal color, all measured traits displayed male-biased sexual dimorphism in our experimental population. Regarding nectar sugar content, sexual dimorphism has been found in several species, but with no clear trend regarding the identity of the more rewarding sex (Eckhart, 1999). In our case, sugar reward was found to be higher in female flowers, although the high number of flowers in male plants over-compensates this difference at the plant level, which was also documented in the sister species, *Silene latifolia* (Gehring et al., 2004). The only non-sexually dimorphic trait in our study was flower color. The function of flower color may not be limited to pollinator attraction, in particular in the case of *S. dioica* that displays bright pink-red flowers although most insects lack red receptors (Briscoe and Chittka, 2001). Other functional roles, such as photoprotection or protection against herbivores, could potentially be equally advantageous for males and females (Strauss and Whittall, 2006; Narbona et al., 2018). All other measured traits showed sexual dimorphism with a higher value found in male plants. The higher number of flowers and larger flowers in males are consistent with the general trend found in most dioecious species (Delph et al., 1996; Eckhart, 1999). The longer flowering duration in males of *S. dioica* has also been found in several other dioecious species (Berry and Gorchov, 2004; Torimaru and Tomaru, 2006).

Interestingly, the selection patterns detected in our study are only partly consistent with the sexual dimorphism observed in our model species. On the one hand, our findings of males having wider corollas and flowering for a longer period of time than females are consistent with sexual selection acting on these traits in male plants. On the other hand, the stronger selection on flower number observed in females appears contradictory with the much higher number of flowers displayed by males in this species. Because flowering duration and total flower number were positively correlated in males, and because flowering duration appeared to be under strong selection in that sex, it is possible that male phenotype is a by-product of the strong selection for longer flowering duration. Another explanation would be that females are subject to a stronger trade-off between flower number and survival as a result of a higher cost of female reproduction (Obeso, 2002). Positive phenotypic selection on flower number in females detected in a single flowering episode might indeed not reflect fitness over the whole life-span. It would thus be interesting to investigate this trade-off between fertility and survival in both sexes, by surveying reproductive success across several reproductive events.

Overall, our findings show that some predictions from sexual selection theory corpus seem to apply well to both animals and plants. Applying sexual selection indexes classically used in animals to plants provides insight on sex-specific selection on attractive traits through another angle. However, the definition of mating success, the general nature of the relationship between reproductive and mating success in plants, and whether or not this depends on the mode of pollination remains unclear and appear to be stimulating perspectives for studies focusing on plant reproduction.

Acknowledgments

We thank T. Janicke for his precious comments that helped improving the manuscript. For laboratory assistance, we thank C. Gode. For greenhouse assistance, we thank E. Schmitt, N. Faure, C. Ponitzki and C. Glorieux. We are grateful to V. Mahut, R. Boisserie, N. Le Roux and P. Drouvin for help in collecting the data. We thank A. Duputié for the development of the image analysis script. For fruitful discussion related to the project, we thank J. Shykoff, N. Sletvold, C. Devaux and J. Tonnabel.

Funding

This work is a contribution to the CPER research project CLIMIBIO. The authors thank the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Hauts-de-France Region and the European Funds for Regional Economical Development for their financial support to this project.

References

Aizen, M. A. and Harder, L. D. (2007). Expanding the limits of the pollen-limitation concept: effects of pollen quantity and quality. *Ecology*, 88:271–281.

Anthes, N., Häderer, I. K., Michiels, N. K., and Janicke, T. (2016). Measuring and interpreting sexual selection metrics: evaluation and guidelines. *Methods in Ecology and Evolution*, 8:918–931.

Arnold, S. J. (1994). Bateman's principles and the measurement of sexual selection in plants and animals. *The American Naturalist*, 144:S126–S149.

Arnold, S. J. and Duvall, D. (1994). Animal mating systems: a synthesis based on selection theory. *The American Naturalist*, 143:317–348.

Ashman, T.-L. and Diefenderfer, C. (2001). Sex ratio represents a unique context for selection on attractive traits: consequences for the evolution of sexual dimorphism. *The American Naturalist*, 157:334–347.

Austen, E. J. and Weis, A. E. (2016). Estimating selection through male fitness: three complementary methods illuminate the nature and causes of selection on flowering time. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283:20152635.

Baena-Díaz, F., Zemp, N., and Widmer, A. (2019). Insights into the genetic architecture of sexual dimorphism from an interspecific cross between two diverging *Silene* (Caryophyllaceae) species. *Molecular Ecology*, 28:5052–5067.

Baker, H. G. (1947). *Melandrium dioicum* (L. emend) Coss. & Germ. *Journal of Ecology*, 35:283–292.

Barbot, E., Dufaÿ, M., and De Cauwer, I. (in prep. D). Determinants of pollen load variation in natural populations of a dioecious insect-pollinated species.

Barrett, S. C. H. and Hough, J. (2012). Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany*, 64:67–82.

Bateman, A. J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2:349–368.

Berry, E. J. and Gorchov, D. L. (2004). Reproductive biology of the dioecious understorey palm *Chamaedorea radicalis* in a Mexican cloud forest: pollination vector, flowering phenology and female fecundity. *Journal of Tropical Ecology*, 20:369–376.

Biesmeijer, J. C. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313:351–354.

Bopp, S. and Gottsberger, G. (2004). Importance of *Silene latifolia* ssp. *alba* and *S. dioica* (Caryophyllaceae) as host plants of the parasitic pollinator *Hadena bicruris* (Lepidoptera, Noctuidae). *Oikos*, 105:221–228.

Briscoe, A. D. and Chittka, L. (2001). The evolution of color vision in insect. *Annual Review of Entomology*, 46:471–510.

Briscoe Runquist, R. D., Geber, M. A., Pickett-Leonard, M., and Moeller, D. A. (2017). Mating system evolution under strong pollen limitation: evidence of disruptive selection through male and female fitness in *Clarkia xantiana*. *The American Naturalist*, 189:549–563.

Burd, M. and Callahan, H. S. (2000). What does the male function hypothesis claim? *Journal of Evolutionary Biology*, 13:735–742.

Carlsson-Granér, U., Elmqvist, Ågren, J., Gardfjell, and Ingvarsson (1998). Floral sex ratios, disease and seed set in dioecious *Silene dioica*. *Journal of Ecology*, 86:79–91.

Caruso, C. M., Eisen, K. E., Martin, R. A., and Sletvold, N. (2019). A meta-analysis of the agents of selection on floral traits. *Evolution*, 73:4–14.

Conner, J. K. and Rush, S. (1996). Effects of flower size and number on pollinator visitation to wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia*, 105:509–516.

Cuthill, I. C., Bennett, A. T. D., Partridge, J. C., and Maier, E. J. (1999). Plumage reflectance and the objective assessment of avian sexual dichromatism. *The American Naturalist*, 153:183–200.

Dai, C. and Galloway, L. F. (2013). Sexual selection in a hermaphroditic plant through female reproductive success. *Journal of Evolutionary Biology*, 26:2622–2632.

Darwin, C. (1871). *The descent of man, and selection in relation to sex*. John Murray, London.

De Cauwer, I., Arnaud, J.-F., Klein, E. K., and Düfay, M. (2012). Disentangling the causes of heterogeneity in male fecundity in gynodioecious *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *New Phytologist*, 195:676–687.

Delph, L. F. (1999). Sexual dimorphism in life history. In *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*, pages 149–173. Springer Berlin Heidelberg, Berlin.

Delph, L. F. and Ashman, T.-L. (2006). Trait selection in flowering plants: how does sexual selection contribute? *Integrative and Comparative Biology*, 46:465–472.

Delph, L. F., Galloway, L. F., and Stanton, M. L. (1996). Sexual dimorphism in flower size. *The American Naturalist*, 148:299–320.

Delph, L. F. and Herlihy, C. R. (2012). Sexual, fecundity, and viability selection on flower size and number in a sexually dimorphic plant. *Evolution*, 66:1154–1166.

Dufaÿ, M., Vaudey, V., De Cauwer, I., Touzet, P., Cuguen, J., and Arnaud, J.-F. (2008). Variation in pollen production and pollen viability in natural populations of gynodioecious *Beta vulgaris* ssp. *maritima* : evidence for a cost of restoration of male function? *Journal of Evolutionary Biology*, 21:202–212.

Eckhart, V. M. (1999). Sexual dimorphism in flowers and inflorescences. In *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin.

Elle, E. and Meagher, T. R. (2000). Sex allocation and reproductive success in the andromonoecious perennial *Solanum carolinense* (Solanaceae). II. Paternity and functional gender. *The American Naturalist*, 156:622–636.

Farwig, N., Bailey, D., Bochud, E., Herrmann, J. D., Kindler, E., Reusser, N., Schüepp, C., and Schmidt-Entling, M. H. (2009). Isolation from forest reduces pollination, seed predation and insect scavenging in Swiss farmland. *Landscape Ecology*, 24:919–927.

Gehring, J. L., Scoby, J., Parsons, M., and Delph, L. F. (2004). Whole-plant investment in nectar is greater for males than pollinated females in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Evolutionary Ecology Research*, 6:1237–1252.

Harder, L. D. and Johnson, S. D. (2009). Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytologist*, 183:530–545.

Hemborg, Å. M. (1998). Seasonal dynamics in reproduction of first-year females and males in *Silene dioica*. *International Journal of Plant Sciences*, 159:958–967.

Hemborg, Å. M. and Bond, W. J. (2005). Different rewards in female and male flowers can explain the evolution of sexual dimorphism in plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85:97–109.

Henshaw, J. M., Jennions, M. D., and Kruuk, L. E. B. (2018). How to quantify (the response to) sexual selection on traits. *Evolution*, 72:1904–1917.

Hereford, J., Hansen, T. F., and Houle, D. (2004). Comparing strengths of directional selection: how strong is strong? *Evolution*, 58:2133–2143.

Hodgins, K. A. and Barrett, S. C. H. (2008). Natural selection on floral traits through male and female function in wild populations of the heterostylous daffodil *Narcissus triandrus*. *Evolution*, 62:1751–1763.

Holtz, Y., Ardisson, M., Ranwez, V., Besnard, A., Leroy, P., Poux, G., Roumet, P., Viader, V., Santoni, S., and David, J. (2016). Genotyping by sequencing using specific allelic capture to build a high-density genetic map of durum wheat. *PLoS ONE*, 11:e0154609.

Houle, D., Pélabon, C., Wagner, G. P., and Hansen, T. F. (2011). Measurement and meaning in biology. *The Quarterly Review of Biology*, 86:3–34.

Jalas, J. and Suhominen, J. (1986). *Atlas florae europaeae: distribution of vascular plants in Europe. 7. Caryophyllaceae (Silenoideae)*. Cambridge University Press, Cambridge.

Janicke, T., Häderer, I. K., Lajeunesse, M. J., and Anthes, N. (2016). Darwinian sex roles confirmed across the animal kingdom. *Science Advances*, 2:e1500983.

Jennions, M. D. and Kokko, H. (2010). Sexual selection. In *Evolutionary behavioral ecology*. Oxford University Press, Oxford.

Johnson, M. G. and Shaw, A. J. (2016). The effects of quantitative fecundity in the haploid stage on reproductive success and diploid fitness in the aquatic peat moss *Sphagnum macrophyllum*. *Heredity*, 116:523–530.

Jones, A. G. (2009). On the opportunity for sexual selection, the Bateman gradient and the maximum intensity of sexual selection. *Evolution*, 63:1673–1684.

Jürgens, A., Witt, T., and Gottsberger, G. (1996). Reproduction and pollination in Central European populations of *Silene* and *Saponaria* species. *Botanica Acta*, 109:316–324.

Kalinowski, S. T., Taper, M. L., and Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16:1099–1106.

Kay, Q. O. N., Lack, A. J., Bamber, F. C., and Davies, C. R. (1984). Differences between sexes in floral morphology, nectar production and insect visits in a dioecious species, *Silene dioica*. *New Phytologist*, 98:515–529.

Kemp, D. J., Herberstein, M. E., Fleishman, L. J., Endler, J. A., Bennett, A. T. D., Dyer, A. G., Hart, N. S., Marshall, J., and Whiting, M. J. (2015). An integrative framework for the appraisal of coloration in nature. *The American Naturalist*, 185:705–724.

Ketterson, E. D., Parker, P. G., Raouf, S. A., Nolan, V., Ziegenfus, C., and Chandler, C. R. (1998). The relative impact of extra-pair fertilizations on variation in male and female reproductive success in dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). *Ornithological Monographs*, pages 81–101.

Klug, H., Heuschele, J., Jennions, M. D., and Kokko, H. (2010). The mismeasurement of sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 23:447–462.

Knight, T. M., Steets, J. A., Vamosi, J. C., Mazer, S. J., Burd, M., Campbell, D. R., Dudash, M. R., Johnston, M. O., Mitchell, R. J., and Ashman, T.-L. (2005). Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36:467–497.

Lande, R. and Arnold, S. J. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 37:1210–1226.

Lau, J. A., Miller, R. E., and Rausher, M. D. (2008). Selection through male function favors smaller floral display size in the common morning glory *Ipomoea purpurea* (Convolvulaceae). *The American Naturalist*, 172:63–74.

Maia, R., Gruson, H., Endler, J. A., and White, T. E. (2019). *pavo2*: New tools for the spectral and spatial analysis of colour in R. *Methods in Ecology and Evolution*, 10:1097–1107.

Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B., and Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7:639–655.

Matsumura, S., Arlinghaus, R., and Dieckmann, U. (2012). Standardizing selection strengths to study selection in the wild: a critical comparison and suggestions for the future. *BioScience*, 62:1039–1054.

Ming, R., Bendahmane, A., and Renner, S. S. (2011). Sex chromosomes in land plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62:485–514.

Moore, J. C. and Pannell, J. R. (2011). Sexual selection in plants. *Current Biology*, 21:R176–R182.

Moquet, L., Lateur, L., Jacquemart, A.-L., De Cauwer, I., and Düfay, M. (2020). Temporal dynamics of sexual dimorphism in a dioecious species. *Annals of Botany*, 126:471–480.

Murphy, C. G. (1998). Interaction-independent sexual selection and the mechanisms of sexual selection. *Evolution*, 52:8–18.

Narbona, E., Jaca, J., del Valle, J. C., Valladares, F., and Buide, M. L. (2018). Whole-plant reddening in *Silene germana* is due to anthocyanin accumulation in response to visible light. *Plant Biology*, 20:968–977.

Obeso, J. R. (2002). The costs of reproduction in plants. *New Phytologist*, 155:321–348.

O'Connell, L. M. and Johnston, M. O. (1998). Male and female pollination success in a deceptive orchid, a selection study. *Ecology*, 79:1246–1260.

Ollerton, J., Winfree, R., and Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120:321–326.

Osorio, D. and Vorobyev, M. (2005). Photoreceptor sectral sensitivities in terrestrial animals: adaptations for luminance and colour vision. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272:1745–1752.

Pannell, J. R. and Labouche, A.-M. (2013). The incidence and selection of multiple mating in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368:20120051.

Paterno, G. B., Silveira, C. L., Kollmann, J., Westoby, M., and Fonseca, C. R. (2020). The maleness of larger angiosperm flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117:10921–10926.

Pau, G., Fuchs, F., Sklyar, O., Boutros, M., and Huber, W. (2010). *EBImage* - an R package for image processing with applications to cellular phenotypes. *Bioinformatics*, 26:979–981.

Peterson, R., Slovin, J. P., and Chen, C. (2010). A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *International Journal of Plant Biology*, 1:13.

Pfister, S. C., Eckerter, P. W., Krebs, J., Cresswell, J. E., Schirmel, J., and Entling, M. H. (2018). Dominance of cropland reduces the pollen deposition from bumble bees. *Scientific Reports*, 8:13873.

Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., and Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25:345–353.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9:671–675.

Sletvold, N. and Ågren, J. (2010). Pollinator-mediated selection on floral display and spur length in the orchid *Gymnadenia conopsea*. *International Journal of Plant Sciences*, 171:999–1009.

Strauss, S. Y. and Whittall, J. B. (2006). Non-pollinator agents of selection on floral traits. In *Ecology and evolution of flowers*, pages 120–138. Oxford University Press, Oxford.

Team, R. D. C. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Thomann, M., Imbert, E., Devaux, C., and Cheptou, P.-O. (2013). Flowering plants under global pollinator decline. *Trends in Plant Science*, 18:353–359.

Thompson, C. G., Kim, R. S., Aloe, A. M., and Becker, B. J. (2017). Extracting the variance inflation factor and other multicollinearity diagnostics from typical regression results. *Basic and Applied Social Psychology*, 39:81–90.

Tonnabel, J., David, P., Klein, E. K., and Pannell, J. R. (2019a). Sex-specific selection on plant architecture through "budget" and "direct" effects in experimental populations of the wind-pollinated herb, *Mercurialis annua*. *Evolution*, 73:897–912.

Tonnabel, J., David, P., and Pannell, J. R. (2019b). Do metrics of sexual selection conform to Bateman's principles in a wind-pollinated plant? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286:20190532.

Torimaru, T. and Tomaru, N. (2006). Relationships between flowering phenology, plant size, and female reproductive output in a dioecious shrub, *Ilex leucoclada* (Aquifoliaceae). *Canadian Journal of Botany*, 84:1860–1869.

Trunschke, J., Sletvold, N., and Ågren, J. (2017). Interaction intensity and pollinator-mediated selection. *New Phytologist*, 214:1381–1389.

van Kleunen, M. and Burczyk, J. (2008). Selection on floral traits through male fertility in a natural plant population. *Evolutionary Ecology*, 22:39–54.

Vaughton, G. and Ramsey, M. (1998). Floral display, pollinator visitation and reproductive success in the dioecious perennial herb *Wurmbea dioica* (Liliaceae). *Oecologia*, 115:93–101.

Wade, M. J. (1979). Sexual selection and variance in reproductive success. *The American Naturalist*, 114:742–764.

Wade, M. J. and Arnold, S. J. (1980). The intensity of sexual selection in relation to male sexual behaviour, female choice, and sperm precedence. *Animal Behaviour*, 28:446–461.

Waelti, M. O., Page, P. A., Widmer, A., and Schiestl, F. P. (2009). How to be an attractive male: floral dimorphism and attractiveness to pollinators in a dioecious plant. *BMC Evolutionary Biology*, 9:190.

Warmke, H. E. (1946). Sex determination and sex balance in *Melandrium*. *American Journal of Botany*, 33:648–660.

Westerbergh, A. and Saura, A. (1994). Gene flow and pollinator behaviour in *Silene dioica* populations. *Oikos*, 71:215–224.

Willson, M. F. and Burley, N. (1983). *Mate choice in plants: tactics, mechanisms and consequence*. Princeton University Press, Princeton.

Supplementary material

Appendix A

Table SA1: Properties of the five nuclear microsatellites used for individuals' genotypic characterization.

Marker	Range size (pb)	Fluorochrome	Tandem repeats	Allele number	Forward sequence	Reverse sequence
Sd05	148-248	NED	(CT)12	63	ATGGTATTGAGGCACTTCGG	GCATCCATCAAAGAGGCAAT
Sd19	141-161	Tail-Hex	(CT)9	11	TTGACGTAAACAAAGCCCAG	GTGATTGGGAAATTGGGATG
Sd23	218-230	HEX	(AGG)8	3	GATGGCCTATGCAAGATGGT	TTTGCTTGTGCTGAACCTTG
Sd25	170-176	FAM	(AAG)8	3	CAGCAGAAGAAAGGACCAGG	AGCATTAGCCTCAGCATTGG
Sn03	211-235	FAM	(AG)8	7	AAGCTTCATCAAATGAAATCGG	GGTGGAGGAGAAGACCACAG

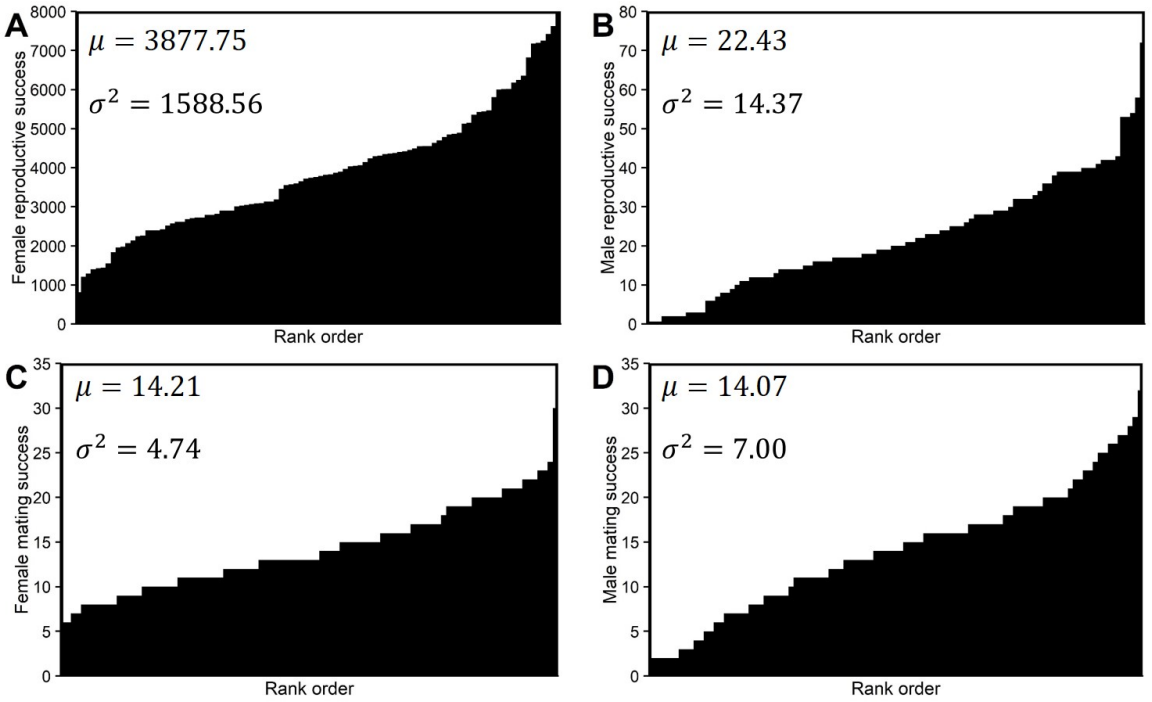


Figure SA1: Variation in reproductive success for OP females (A) and OP males (B). Variation in mating success for OP females (C) and OP males (D). Mean μ and variance σ^2 for each estimator and sex are indicated.

Table SA2: Correlations between traits for OP females (upper side) and males (lower side).

	S. nb	H.	Co. w.	Ca. h.	Nect.	PC1	PC2	PC3	P. l.	P. w.	P. cl. l.	P. a.	P. e	P. b.	T. fl.	D. fl.	Nb g..	Fl. dur.
S. nb		**0.316**	0.014	-0.071	0.137	0.021	0.052	0.088	-0.090	-0.111	-0.016	-0.115	0.046	0.064	**0.484**	**0.701**	-0.211	-0.212
H.	**0.542**		-0.024	-0.039	-0.022	-0.186	-0.072	0.207	-0.113	-0.019	-0.134	-0.009	-0.129	-0.049	0.127	**0.385**	0.025	-0.409
Co. w.	**-0.488**	-0.136		**0.467**	0.047	0.054	-0.154	0.063	**0.519**	**0.397**	**0.385**	**0.529**	0.079	-0.052	-0.056	0.190	0.215	-0.063
Ca. h.	-0.079	0.097	**0.417**		0.140	0.079	-0.167	0.127	**0.429**	0.256	0.196	**0.344**	0.184	-0.194	-0.057	-0.014	0.072	0.148
Nect.	-0.020	0.070	0.073	0.006		0.036	-0.202	-0.173	0.350	**0.367**	0.293	0.332	-0.060	0.006	0.111	0.082	0.064	-0.053
PC1	-0.179	-0.212	0.101	0.161	-0.257		-0.214	-0.307	0.130	0.061	-0.163	0.100	0.103	-0.286	-0.060	-0.088	-0.075	0.033
PC2	0.179	0.190	-0.062	-0.048	-0.204	0.161		-0.084	-0.269	-0.127	-0.040	-0.175	-0.137	0.206	0.065	0.079	-0.043	-0.031
PC3	-0.203	-0.031	0.009	-0.008	**-0.329**	0.267	0.107		-0.124	-0.177	-0.056	-0.143	0.084	0.036	-0.119	0.263	-0.159	-0.140
P. l.	**-0.413**	-0.127	**0.719**	0.164	0.122	-0.114	-0.110	-0.114		**0.726**	**0.573**	**0.868**	0.260	-0.294	-0.204	-0.183	0.182	-0.016
P. w.	**-0.344**	0.013	**0.519**	0.014	0.198	-0.250	-0.074	-0.092	**0.749**		**0.407**	**0.933**	**-0.467**	-0.241	-0.191	-0.148	0.260	-0.141
P. cl. l.	-0.280	-0.107	**0.539**	0.006	0.128	-0.256	-0.117	-0.101	**0.709**	**0.681**		**0.441**	0.160	**0.604**	-0.032	0.025	0.263	-0.025
P. a.	**-0.390**	0.000	**0.606**	0.053	0.201	-0.196	-0.099	-0.083	**0.855**	**0.954**	**0.683**		-0.199	-0.328	-0.226	-0.158	0.212	-0.172
P. e	-0.002	-0.125	0.131	0.220	-0.137	0.252	-0.049	0.019	0.131	**-0.544**	-0.139	**-0.326**		-0.042	-0.005	-0.031	-0.124	0.182
P. b.	-0.081	-0.059	0.224	-0.106	0.123	-0.284	-0.075	-0.081	0.277	**0.424**	**0.861**	**0.336**	**-0.311**		0.182	0.213	0.112	-0.025
T. fl.	**0.541**	**0.313**	**-0.286**	0.103	-0.121	0.121	0.186	-0.016	**-0.405**	**-0.496**	**-0.396**	**-0.430**	0.287	-0.317		**0.370**	**-0.391**	0.131
D. fl.	**0.806**	**0.470**	**-0.330**	-0.006	-0.037	-0.202	0.182	-0.195	**-0.359**	**-0.373**	-0.257	**-0.376**	0.113	-0.110	**0.690**		-0.151	-0.363
Nb g.	-0.103	0.021	0.146	0.206	0.002	-0.039	-0.196	0.047	0.159	0.155	0.024	0.145	-0.047	-0.022	-0.201	-0.051		-0.093
Fl. dur.	0.044	-0.088	0.053	0.205	-0.037	**0.313**	0.113	0.004	-0.312	**-0.370**	**-0.313**	**-0.364**	0.178	-0.215	**0.396**	**0.206**	**-0.263**	

Note: Correlation coefficients that were statistically significant after Bonferroni correction are colored, with positive correlations in blue and negative correlations in orange. Traits removed for study of selection gradients are colored in light grey whereas those retained are not. Correlations between (i) petal measures and (ii) petal composite indexes (i.e. petal shape) are not relevant. Abbreviations: S. nb = Stem number (mean); H. = Height (max); Co. w. = Corolla width (mean); Ca. h. = Calyx height (mean); Nect. = Nectar sugar content; PC1 = PC1 color; PC2 = PC2 color; PC3 = PC3 color; P. l. = Petal length; P. w. = Petal width; P. cl. l. = Petal cleft length; P. a. = Petal area; P. e. = Petal shape (elongation); P. b. = Petal shape (bifidity); T. fl. = Total flower number; D. fl. = Daily flower number; Nb g. = Number of gametes per flower; Fl. dur. = Flowering duration

Appendix B

Text SB1: Mean-standardized selection differentials and gradients

In addition to variance(SD)-standardized selection gradient β_σ, we estimate mean-standardized selection gradients β_μ which are dimensionless too (Hereford et al., 2004; Houle et al., 2011; Matsumura et al., 2012). Those have the main advantage to take into account fitness elasticity (i.e. proportional change in fitness relative to proportional change in trait), and thus are not confound by phenotypic variance. Variance(SD)-standardized selection gradients β_σ are obtained by estimating selection as described in the Lande & Arnold (1983), that is by working on centered-scaled traits. Mean-standardized selection gradients β_μ are obtained by multiplying variance(SD)-standardized selection gradients β_σ by the mean of the population phenotypic trait μ_P and dividing by the standard-deviation of the population phenotypic trait β_σ (Matsumura et al., 2012) :

$$\beta_\mu = \mu_P \times \frac{\beta_\sigma}{\beta_\sigma}$$

In this context, the benchmark for strong selection on a trait is 1 (i.e. because selection on fitness itself has a mean-standardized selection gradient of 1; Hereford et al., 2004).

References

Hereford J., Hansen T.F., Houle D. (2004). Comparing strengths of directional selection: how strong is strong? *Evolution*, 58:2133–2143.

Houle D., Pélabon C., Wagner G.P., Hansen T.F. (2011). Measurement and meaning in biology. *The Quarterly Review of Biology*, 86:3–34.

Matsumura S., Arlinghaus R., Dieckmann U. (2012). Standardizing selection strengths to study selection in the wild: a critical comparison and suggestions for the future. *BioScience*, 62:1039–1054.

Lande R., Arnold S.J. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 37:1210–1226.

Table SB1: Mean-standardized selection differentials on all traits measured.

Traits	β_μ HP females	β_μ OP females	β_μ OP males
Stem number (mean)	0.095	0.125	-0.055
Height (max)	0.131	0.245	-0.076
Corolla width (mean)	0183	0.271	1.197
Calyx height (mean)	0.216	-0.198	0.648
Nectar sugar content	-0.011	0.036	-0.024
1st PC petal color	0.000	0.000	-0.001
2nd PC petal color	0.000	-4.751	0.000
3rd PC petal color	0.000	0.000	0.000
Petal length	-0.168	0.176	-0.146
Petal width	-0.550	0.179	-0.463
Petal cleft length	-0237	0.355	-0.301
Petal area	-0.263	0.030	-0.341
Petal shape (elongation)	0.709	-0.044	0.542
Petal shape (bifidity)	-0.295	0.379	-0.361
Total number of flowers	0.103	0.156	0.048
Daily flower number (mean)	0.115	0.107	0.065
Number of gametes per flower	0.051	0.072	-0.037
Flowering duration	0.019	0.083	0.941

Table SB2: Mean-standardized selection gradients on traits included in mixed models.

Traits	β_μ HP females	β_μ OP females	β_μ OP males
Height (max)	-0.064	0.045	0.329
Corolla width (mean)	0.299	0.075	1.261
Calyx height (mean)	-0.414	-0.898	-1.106
Nectar sugar content	0.046	0.033	-0.059
1st PC petal color	0.001	-0.001	-0.001
Petal shape (elongation)	0.894	0.062	0.319
Daily flower number (mean)	0.371	0.433	-0.099
Number of gametes per flower	0.811	0.820	0.055
Flowering duration	0.315	0.241	1.493

Table SB3: Mean-standardized mating gradients on traits included in mixed models.

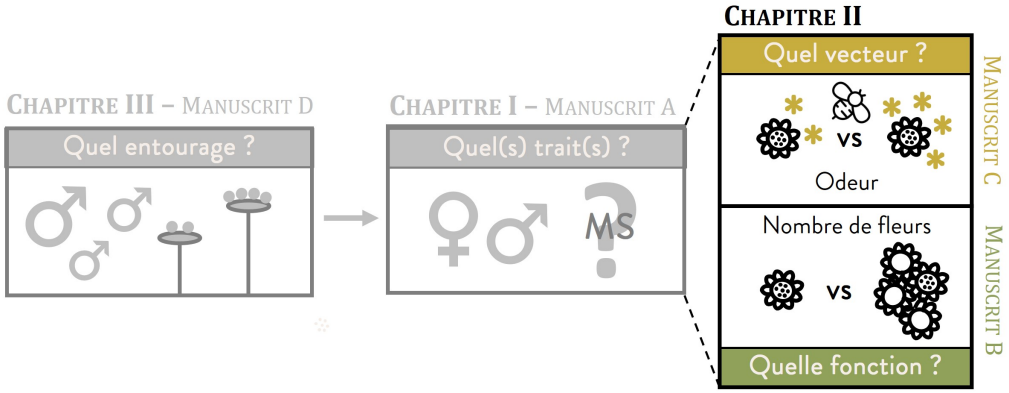
Traits	β_μ OP females	β_μ males
Height (max)	-0.027	0.220
Corolla width (mean)	0.140	0.846
Calyx height (mean)	-0.544	-0.730
Nectar sugar content	0.050	-0.094
1st PC petal color	0.000	-0.002
Petal shape (elongation)	0.584	0.272
Daily flower number (mean)	0.229	-0.118
Number of gametes per flower	0.391	0.075
Flowering duration	0.231	1.135

Chapitre II

Rôle des pollinisateurs dans la sélection

Résumé en français du chapitre II

Les pollinisateurs jouent un rôle déterminant dans l'accès à la reproduction chez les espèces zoogames. Dans ce chapitre, le point est fait sur les avantages sélectifs des traits floraux en termes d'attraction des pollinisateurs. Une approche de manipulation phénotypique permet de mieux comprendre les effets de deux traits floraux particuliers : le nombre de fleurs (manuscrit B) et un composé volatile classiquement impliqué dans l'attraction des pollinisateurs, le phenylacetylaldehyde (PAA, manuscrit C ; Campbell, 2009).



Le nombre de fleurs a été estimé sous sélection plus forte chez les femelles par rapport aux mâles dans le premier chapitre. Ce résultat est contraire aux attendus de l'hypothèse de la fonction mâle, qui stipule que le nombre de fleurs devrait être sous plus forte sélection par le biais de la fonction mâle chez les hermaphrodites, parce qu'il permet d'augmenter l'export de pollen. Au contraire, la fonction femelle, théoriquement plutôt limitée par les ressources disponibles, devrait moins bénéficier d'une augmentation de la production de fleurs (Burd & Callahan, 2000). Néanmoins, cette plus forte sélection sur le nombre de fleurs estimée chez les femelles semble ne passer que par la fécondité, d'après la comparaison avec le gradient de sélection sur le nombre de fleurs chez les femelles supplémentées. Le nombre de fleurs étant lié à la fois à la fécondité et à l'attraction des pollinisateurs, cette expérimentation vise à comprendre l'effet de ce dernier chez les deux sexes. Dans le manuscrit B, la sélection par le biais de l'attraction des pollinisateurs est estimée à l'aide de fleurs artificielles. Deux traitements sont mis en place : le premier traitement avec un nombre de fleurs non-manipulé (*floral display* naturel), et le second traitement avec un nombre de fleurs doublé (*floral display* artificiel). A nombre de gamètes égal entre ces deux groupes, tout bénéfice associé au traitement ne peut s'expliquer que par une plus forte attraction des pollinisateurs, vérifiée à l'aide d'observations du nombre de visites par les pollinisateurs. Pour les femelles, aucune différence sur la sélection sur le nombre de fleurs n'est montrée entre les deux groupes. En revanche, chez les mâles, le groupe avec un floral display artificiel montre une plus grande sélection sur le nombre de vraies fleurs. Par ailleurs, la sélection sexuelle sur le nombre de fleurs diffère selon le traitement entre les deux sexes, avec une sélection sexuelle[1] amoindrie sur le nombre de fleurs pour les femelles. Ce résultat semble pointer du doigt un avantage plus important chez les mâles à attirer les pollinisateurs, et donc à exporter leur pollen.

[1] les résultats vis-à-vis du *mating success* sont préliminaires. Les effets de la méthode d'échantillonnage sur l'estimation du *mating success* (au nombre fixe sur les femelles, au pro rata sur les femelles, au nombre fixe chez les deux sexes, voir *supplementary materials*) devront être plus finement étudiés à l'aide de simulations.

Les composés volatiles sont reconnus comme ayant un rôle prédominant dans l'attraction des pollinisateurs (Schiestl, 2010). Bien qu'à ce jour rien ne soit connu sur le dimorphisme sexuel pour ce trait chez *Silene dioica*, le dimorphisme observé dans le nombre de fleurs laisse a priori supposer une plus grande émission d'odeur chez les mâles, ce qui est le cas chez de nombreuses espèces dioïques (Ashman, 2009). Ce trait pourrait ainsi avoir évolué sous l'action d'une sélection sexuelle plus forte chez les mâles que chez les femelles, par le biais de l'action des odeurs sur l'attraction des pollinisateurs. Par ailleurs, il est supposé que l'émission d'odeur ait un plus fort impact sur l'attraction des pollinisateurs nocturnes par rapport aux pollinisateurs diurnes (Raguso et al., 2003). Dans ce manuscrit, nous nous intéressons au effet du PAA en termes de sélection sur les traits floraux, ainsi qu'aux patrons de sélection selon la communauté de pollinisateurs (diurnes versus nocturnes). Le résultat majeur de cette étude est que nos traitements expérimentaux (avec versus sans adjonction de PAA, et communauté de pollinisateurs diurne versus nocturne) affectent majoritairement les patrons de sélection chez les mâles. Des études futures devraient permettre de documenter les variations d'odeur entre les sexes chez *Silene dioica*, et leurs effets en termes d'attraction de pollinisateurs et de succès reproducteur chez les deux sexes.

References

Ashman T-L. (2009). Sniffing out patterns of sexual dimorphism in floral scent. *Functional Ecology*, 23:852–862.

Burd M., Callahan H.S. (2000). What does the male function hypothesis claim? *Journal of Evolutionary Biology*, 13:735–742.

Campbell D.R. (2009). Using phenotypic manipulations to study multivariate selection of floral trait associations. *Annals of Botany*, 103:1557–1566.

Raguso R.A., Levin R.A., Foose S.E., Holmberg M.W., McDade L.A. (2003). Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination "syndromes" in *Nicotiana*. *Phytochemistry*, 63:265–284.

Schiestl F.P. (2010). The evolution of floral scent and insect chemical communication. *Ecology Letters*, 13:643–656.

- Manuscript B -

On the function of flower number: disentangling fertility from pollinator-mediated sexual and natural selection

Estelle Barbot[1,3], Mathilde Dufaÿ[2], Jeanne Tonnabel[2], Cécile Godé[1] and Isabelle De Cauwer[1]

Authors affiliation:
[1] Univ. Lille, CNRS, UMR 8198 - Evo-Eco-Paleo, F-59000 Lille, France
[2] CEFE, Univ Montpellier, CNRS, Univ Paul Valéry Montpellier 3, EPHE, IRD, Montpellier, France
[3] Corresponding author: Estelle Barbot, E-mail: estelle.barbot@protonmail.com

In preparation

Contents

Abstract . . . 111
Introduction . . . 113
Material and methods . . . 115
Study system . . . 115
Plant material . . . 115
Experimental design . . . 115
Pollinator observations . . . 116
Trait measurement . . . 116
Female reproductive success . . . 117
Male reproductive success . . . 117
Estimation of mating success . . . 118
Statistical analysis . . . 118
Results . . . 121
No evidence for pollen limitation . . . 121
Phenotypic manipulation increased pollinator visitation . . . 121
Pollen dispersal distance was influenced by flower number . . . 121
Selection patterns differ between sexes . . . 121
Discussion . . . 123
Female reproductive success is mainly driven by gamete production . . . 123
Pollen export enhances male reproductive success . . . 124
Conclusion . . . 125
Bibliography . . . 126
Supplementary materials . . . 131

Abstract

In animal pollinated angiosperms, flower number has historically been described as a trait that is mainly under selection through male function. The rationale behind this "male-function" hypothesis is that reproductive success through the male function should benefit from large floral displays which enhance pollinator attraction, while reproductive success through the female function is expected to be mainly limited by resource availability and should not benefit from an increased floral display. However appealing this theory may be, studies comparing the strength of selection on flower number through male versus female function rarely document the expected asymmetry. This discrepancy could arise from (i) the fact that reproductive success through the female function might often be pollen limited and/or (ii) the fact that flower number does not only play a role in pollinator attraction, but also directly impacts the number of ovules and/or pollen grains produced by an individual. The only possible way to disentangle selection through gamete production from selection through pollinator attraction is to use phenotypic manipulation. In this study, by artificially increasing floral displays with dummy flowers, we explore the benefits of exhibiting a showier visual signal in female and males of a dioecious species, both in terms of reproductive success and in terms of access to reproductive partners. We show that this artificial increase in floral display indeed enhances pollinator attraction, and that it results in a stronger selection on flower number, in males only.

Key words: sexual selection – attraction – gametes – sexual dimorphism – "male-function" hypothesis

Introduction

Darwin himself introduced the notion of sexual selection, advocating that certain traits are selected because they enhance individual fitness through mating success, the number of sexual partners, regardless of their effect on fertility or survival (Darwin, 1871). According to theory, anisogamy should result in male reproductive success being more limited by mate acquisition than female reproductive success (Bateman, 1948; Trivers, 1972; Jennions and Kokko, 2010). Across the animal kingdom, this is widely supported by two lines of evidence. First, empirical studies measuring sex-specific Bateman's gradients, the slope of the regression of reproductive success on mating success, generally find this relation to be steeper in males than in females (Janicke et al., 2016). Second, male biased sexual dimorphism is pervasive in animal taxa, particularly in reptiles, birds and mammals, suggesting stronger selection on male phenotypes (Janicke et al., 2016; Mori et al., 2017).

The scope for such sex differences in the dependence of reproductive success on access to sexual partners has long been suggested to include all sexually reproducing organisms subject to anisogamy, thus including plants (Bateman, 1948; Arnold, 1994). In animals, during the pre-copulation phase of reproduction, sexual selection can involve (i) competition for the access to sexual partners (usually among males) and/or (ii) choice of sexual partners (usually by females; Jennions and Kokko, 2010). In plants, during the pre-pollination phase of reproduction, sexual selection could operate through male intrasexual competition to access receptive stigmas (Moore and Pannell, 2011), but also, in the common situation of pollen limitation (Burd, 1994; Knight et al., 2005), through female intrasexual competition to receive viable pollen. One might thus expect between-sex differences in the intensity of sexual selection to decrease with increasing pollen limitation, as observed in broadcast spawning animals when male gametes become limiting (Levitan, 2010).

Yet, there are at least two marked differences in how sexual selection is expected to operate in plants compared to animals. First, most flowering plants are hermaphroditic, although this should not prevent sexual selection to act through both sexual functions within the same organism (Arnold, 1994; Morgan, 1994). Second, the pre-pollination phase (i.e. pollen dispersal and receipt) involves a third party – the pollinators – in a vast majority of angiosperm species (Ollerton et al., 2011). Sexual selection mediated by pollinators can thus be expected to drive the evolution ofphenotypic traits linked with pollinator attraction, with obvious parallels with mate attraction in animals (Lloyd and Webb, 1977; Moore and Pannell, 2011). In this respect, a wide range of floral traits has been demonstrated to be involved in pollinator attraction, such as nectar quantity (Hodges, 1995), flower size (Ashman and Stanton, 1991; Conner and Rush, 1996) or flower number (reviewed in Chittka and Thomson, 2001). In dioecious plants, i.e. species with separate sexes, sexual dimorphism on these floral traits could possibly have evolved through differential sexual selection between sexes (Moore and Pannell, 2011; Barrett and Hough, 2012).

In dioecious species, males generally carry more flowers than females, at least in temperate regions, suggesting stronger directional selection on this trait in males than in females (Eckhart, 1999; Barrett and Hough, 2012). Similarly, in hermaphroditic species, flower number has been historically considered as a typical 'male' trait, as earlier work on sexual selection in plants argued that flower number, beyond a certain threshold, served the purpose of male function only (Queller, 1983; Burd and Callahan, 2000). Indeed, hermaphroditic plants often present low fruit-sets (i.e. produce many flowers that do not mature into fruits; Sutherland and Delph, 1984). The rationale for this "male-function" hypothesis lied in the common observation that flower removal affected pollinator attraction or pollen

removal but not seed production (Queller, 1983; Bell, 1985; Burd and Callahan, 2000; Skogsmyr and Lankinen, 2002). Yet, empirical support for the male-function hypothesis remains ambiguous (Ashman and Morgan, 2004). Indeed, several studies quantifying selection on flower number through both sexual functions in hermaphroditic species found either (i) weaker selection on flower number through male function compared to female function (Broyles and Wyatt, 1990; Sahli and Conner, 2011), (ii) no selection through the male function (Conner et al., 1996) or even (iii) negative selection through the male function (Hodgins and Barrett, 2008; van Kleunen and Burczyk, 2008). In *Silene dioica*, the model species used in the present study, positive selection on flower number was detected in females only in a previous experiment (Barbot et al., in prep. A). Quantifying the effect of flower number through the different components of selection may help to understand why there is such a discrepancy between verbal expectations and empirical data.

Because flower number potentially affects both pollinator attraction and gamete production at the plant-level, it is expected to be subject not only to pollinator-mediated sexual selection but also to fertility selection. Comparing the strength of selection between arrays of hand-pollinated and open-pollinated plants has allowed to partition the effect of pollinator-mediated and fertility selection on flower number in a number of study systems (Sandring and Ågren, 2009; Chen et al., 2017; Trunschke et al., 2017; reviewed in Caruso et al., 2019). One important caveat of this approach, however, is that it focuses on female fitness exclusively, precluding any explicit test of the male-function hypothesis (Ashman and Morgan, 2004).

A powerful method to alleviate this issue is the use of phenotypic manipulation (Campbell, 2009). In animals, experiments manipulating traits thought to be involved in mate acquisition has proven to be a powerful method in sexual selection studies (Moore and Moore, 1999; Cothran et al., 2010; Katayama et al., 2014; Safran et al., 2016). While phenotypic manipulation has permitted to explain the evolution of various floral traits (Cuartas-Domínguez and Medel, 2010; Barrio and Teixido, 2015; Pellegrino et al., 2017), this approach has not yet been applied to explicitly test the male-function hypothesis.

In this study, we performed phenotypic manipulation by adding dummy flowers in both sexes of the dioecious species *Silene dioica*. By doing so, we amplified the visual signal displayed by some plants without changing their gamete production, which allowed us to disentangle the effects of pollinator-mediated selection and fertility selection on flower number. Because our study was performed in a single reproductive season, and during a limited window of time, we cannot claim that we measured overall reproductive or mating success, a common pitfall in studies on perennial species. Nonetheless, for a purpose of simplicity, we will refer hereafter to selection and mating gradient when analyzing correlations between phenotypic traits and, respectively, reproductive and mating success. Comparing selection and mating gradients on flower number between control and manipulated individuals of each sex allowed quantifying the role of pollinator-mediated selection. In each sex, if the number of real flowers has an effect on reproductive or mating success only through fertility selection, one expects the same selection and/or mating gradients on the number of (real) flowers in both control and manipulated plants. An additive effect of the phenotypic manipulation on reproductive and/or mating success would indicate that manipulated plants benefited from an enhanced success through an increased pollinator attraction. Any significant effect of the interaction between treatment and the number of real flowers would mean that the impact of flower number on pollinator attraction is non-additive and depends on the exact number of flowers. Applying this approach in both males and females should thus shed light on the nature of selective pressures acting on flower number and allow

to test for the male function hypothesis.

Material and methods

Study system

Silene dioica (L.) Clairv. is a short-lived perennial herb of the Caryophyllaceae family. This insect-pollinated dioecious plant is widespread throughout northern and central Europe (Baker, 1947; Jalas and Suhominen, 1986). Sex determination is genetic, with males being the heterogametic sex (Warmke, 1946; Ming et al., 2011). The species is sexually dimorphic for flower number and size, with males being more conspicuous than females (Kay et al., 1984; Moquet et al., 2020; Barbot et al., in prep. A). *Silene dioica* displays a generalist pollination with bees and hoverflies as main pollinators (Baker, 1947; Westerbergh and Saura, 1994).

Plant material

An experimental population was set up in a common garden on the campus of Lille University in France (50°36'27.9"N 3°08'36.3"E). No wild conspecifics could be found in a radius of one kilometer. This experimental population was generated using seeds collected in three nearby forests in order to reach a sufficient sample size while avoiding the inclusion of half or full-sibs. All individuals were sown in a greenhouse and placed in separate 0.7-L pots filled with a standard soil mixture.

Experimental design

An array of 172 plants with 1:1 sex-ratio was kept in an insect-proof greenhouse until the beginning of the experiment. The surface area of the experimental plot was of 50 m^2 and local density was 3.3 individuals.m^-2, mirroring typical densities observed in natura. At the flowering peak (31th May 2019), plants were randomly assigned to two treatments and placed in the experimental garden for ten days with individual spatial positions arranged to follow a grid pattern where sexes and treatments were alternated. In the control group (C), flower number were left unmanipulated. It included 43 females (FC) and 43 males (MC). In the treatment group (T), which also included 43 females (FT) and 43 males (MT), the visual signal was amplified by adding enough dummy flowers to double the flower number of each individual (i.e. different numbers of dummy flowers were thus used depending on individual flower production). Dummy flowers were created using crepe paper which was selected based on its color spectra to approach average *S. dioica* petals' reflectance (Barbot et al., in prep. A; Figure SA1). Circles of 3.5cm diameter were cut in the paper with the closest spectra and rolled to roughly mimic *S. dioica*'s flower shape and size (Figure SA2). These dummy flowers were then tied on plants using an invisible nylon thread.

In addition to these open-pollinated plants, a group of 20 females (FHP) were placed in the same experimental garden over the same period and artificially hand-pollinated to estimate the extent of pollen limitation of female reproductive success. All open flowers were supplemented every other day with pollen from a pool of males from the same initial collection, isolated in a greenhouse. Each FHP female received pollen from an average of 20 different males over the course of the experiment, with two males being used for each pollination session for each FHP female. After ten days, all females (FT, FC and FHP) were placed in an insect-proof greenhouse until fruits reached maturity, typically two to three weeks after flower opening.

Pollinator observations

In order to verify that dummy flowers increased pollinator attraction, pollinator visitation patterns were compared between treatments. We conducted observations on groups of ten neighboring plants through three observational sessions of 20 minutes spread over the course of the experiment. Each plant was thus observed for a total of sixty minutes. For each pollinator visit in the group under scrutiny, the identity of the visited plants and the number of flowers visited per plant were noted. A visit was defined as a clear contact between the insect and the reproductive structures of a flower. For each plant, three variables were derived from these observations: (i) binary coded visits (i.e. whether a plant was visited or not over the course of the sixty minutes), (ii) the number of pollinators (i.e. the number of independent insects visiting a given plant) and (iii) the number of flowers visited (i.e. the total number of visited flowers over the course of the sixty minutes).

Trait measurement

We measured flower number and the number of gametes per flower in order to control for overall investment in gametes production at the individual level. We also measured other floral traits: these measurements were reduced using a PCA and included in analyses of reproductive and mating success, in order to control for the overall phenotype of each individual.

Floral traits - A total of thirteen floral traits were measured on all plants: (1) The number of open flowers was measured three times during the course of the experiment (on day one, day five and day ten). Measurements performed on day one and five were used to adjust the number of dummy flowers in FT and MT plants (2) corolla diameter and (3) calyx height were also measured on day one, five and ten of the experiment on two randomly chosen flowers per individual, by using a digital caliper accurate to 0.01 mm. For these three first traits, measures were averaged across dates for each individual prior to the analyses.

The ten remaining traits were characterized once, just before the beginning of the experiment, when plants were still in the insect-proof greenhouse. (4) Nectar volume and (5) concentration were measured on one randomly chosen newly opened flower. Total volume of nectar per flower was assessed using 2μL microcapillary tubes. A refractometer (NAR-1T LIQUID,Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan) was then used to measure sugar concentration in each nectar sample (μg of sucrose equivalent per μL).

On the same flowers, color spectra were characterized by measuring reflected light in the center of the two lobes of a freshly dissected petal every [0.53,0.61] nm within [200,700] nm using a probe connected to an AvaLight-XE ULS2048 spectrometer and to an AvaLight-XE xenon pulsed light source (Avantes, Apeldoorn, the Netherlands). Spectra were calibrated against a fully absorbing black standard and a fully reflecting barium sulfate white standard. For each individual, the two reflectance spectra were averaged (*pavo* package in R, Maia et al., 2019). Reflectance data was then summarized using PCA while keeping only the three first axes, which reflected respectively (6) color luminance, (7) color saturation and (8) reflectance in UV wavelengths (Figure SA3). Finally, another petal was dissected on each collected flower, taped flat and imaged using a high-resolution scanner (Epson Perfection V700 Photo, Seiko Epson, Suwa, Japan). Using an image processing software (ImageJ, Schneider et al., 2012), we then measured (9) petal length from the paracorolla to the apical part, (10) largest width and (11) cleft length. Two indexes of petal shape were then calculated: (12) elongation (i.e. petal length divided by petal width) and (13) bifidity (i.e. petal cleft length divided by petal length).

Gametes production - The number of gametes per flower was assessed for both sexes. For females, half of the mature fruits (one to six fruits per plant) was dissected to estimate ovule production. We imaged fruit content using a high resolution scanner (Epson Perfection V700 Photo, Seiko Epson, Suwa, Japan) and assessed the number of seeds and unfertilized ovules on the basis of size (0.062 ± 0.031 mm^2 for unfertilized ovules versus 0.86 ± 0.12 mm^2 for seeds) using the *EBImage* package in R (Pau et al., 2010). The number of ovules per flower was obtained by summing the number of seeds and unfertilized ovules. Regarding males, the number of pollen grains per flower was estimated on one nearly opened floral bud for each male. Each bud was dissected and pollen size and quantity per flower was estimated using a particle counter (CASY® Model TT, Roche Innovatis AG, Bielefeld, Germany), following the protocol described in Dufaÿ et al. (2008).

Female reproductive success

Seed production was assessed on a subsample of one to six fruits per plant using image processing, as described above. Germination rates were estimated on a sub-sample of 60 seeds per female that were sown in petri dishes filled with 40mL of 10g.L−1 agar in sterile water (photoperiod 14:10 and temperature 21-15°C). For each female, reproductive success over the course of the experiment RS_f was then obtained by multiplying three terms: the mean seed number per fruit, the total number of fruits and the germination rate.

Male reproductive success

Male reproductive success was estimated by genotyping a subsample of offspring. The number of seedlings genotyped for each female reflected its contribution to the total seed pool (23.6 ± 11.4 seeds genotyped per female). Within each female, seedlings were randomly sampled across fruits. Total genomic DNA from adults (86 females and 86 males) and seedlings (2030 individuals) was extracted and PCR assays were used to amplify five nuclear microsatellites following Barbot et al. (in prep. A).

We used a recently developed spatially explicit mixed mating model to assess variances in male reproductive success and in pollen dispersal kernels using genotypes and individual spatial data, as described in Tonnabel et al. (2019a). This model is directly derived from the mixed effect mating model (MEMM) developed by Oddou-Muratorio et al. (2018) which was adapted to account for (i) separate sexes and (ii) inter-individual variance in mean pollen dispersal distances. MEMM models estimate the reproductive success of each male while accounting for the spatial arrangements of potential mates. Contrary to categorical methods of paternity assignments, MEMM models offer a probabilistic approach to estimate male reproductive success that integrates - for each potential father - the probabilities of having sired each genotyped seedling rather than solely retaining the most likely father. For each male in the experimental population, the model computes Bayesian estimates of: (i) mean pollen dispersal distance δ (i.e. thus estimating different pollen dispersal kernels for each male), and (ii) reproductive success RS_m, using a Monte Carlo Markov Chain (MCMC) based on the Metropolis-Hasting algorithm. RS_m, the reproductive success of each male, was defined in MEMM as the sum, across all mothers, of the product of each putative mother i reproductive success RS_{f_i} (provided as model inputs) and the male paternity share with each mother i. RS_m is thus an estimate of the number of seeds that a male sired across all seeds that were produced over the course of the experiment. Both δ and RS_m are random variables modeled with Gamma distributions with means and variances of $(\mu_\delta, \sigma_\delta)$ and $(1, \sigma_{RS})$ respectively. We used wide prior distributions for μ_δ $U(1, 100)$, σ_δ $U(0, 100)$ and σ_{RS} $U(0, 100)$. Pollen migration rate m was also estimated, to assess pollen immigration into the experimental plot (which should be negligible since no wild populations of *S. dioica*

occurred in the neighborhood), and genotyping errors, using a wide prior distribution $U(0,1)$. We fixed the f_0 parameter from Tonnabel et al. (2019a) to 0 given that only one plant was grown in each pot and local seed siring was therefore not possible in our experimental design. We ran three parallel Markov chains for 500,000 iterations after a burn-in of 100,000 iterations, and chains were thinned every 500 iterations for RS_m estimation. Convergence was assessed using several diagnostics available in the ggmcmc library (running means, autocorrelation and Geweke diagnostics; Fernández-i Marín, 2016). Potential scale reduction factors ($\hat{R}$; Brooks and Gelman, 1998) were all converging to 1.

Posterior distributions for pollen dispersal distances δ and male reproductive success RS_m were summarized across MCMC iterations using medians. In order to assess uncertainty on these estimates, a variation coefficient was calculated by dividing the length of the 95% credibility intervals by the median. The inverse of the variation coefficient was then used as weight in the subsequent analyses.

Estimation of mating success

To assess the number of effective mating partners for each individual (i.e. genetic mating success), we performed categorical paternity assignments using CERVUS 3.07, allowing 2% of genotyping error (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007). Paternity was assigned using a 80% confidence criterion. We also estimated mating success using another seedlings sampling method, described in the supplementary material (Supplementary Material SB1; Table SB1; Figure SB1; Figure SB2). Future work will aim at estimating the effect of several sampling methods on male reproductive success estimates, as well as on female and male mating success estimates.

Statistical analysis

Phenotypic homogeneity between groups - For each sex, a multivariate analysis of variance (MANOVA) was performed to ascertain the average homogeneity of the thirteen measured traits among treatments using Wilks' Lambda statistic.

Assessing pollen availability in the experimental plot - The occurrence of pollen limitation was tested by assessing seed-set differences between open-pollinated (FC and FT) and hand-pollinated females (FHP). Seed set was calculated in each dissected fruit as seed number divided by ovule number. Comparisons were performed using a generalized linear model with a binomial distribution. A random individual effect was added in the model assessing the effect of pollination treatment on seed-set because several fruits were sampled for each female (*lme4* package, Bates et al., 2015), and a Wald test was used to test the effect of pollination treatment.

Quantifying the effect of phenotypic manipulation on pollinator visits - Generalized linear models and Wald tests were used to investigate the effect of sex, treatment and their interaction on the different descriptors of pollinator visitation patterns (i.e. binomial distribution for binary visits and Poisson distributions for independent and total visits). This allowed us to assess the effect of phenotypic manipulation on pollinator attraction, and check whether this effect differed between sexes.

Testing the effect of phenotypic manipulation on pollen dispersal distance, reproductive success and mating success - In the following models, the first axis of a PCA on all floral traits (except flower number and gametes number per flower, which were explicitly included in models to account for fertility variations) was set as covariable, in order to describe the general floral phenotype of individuals. This first axis accounted for 27.6% of floral traits' variance for females and 29.8% for males. We only retained the first axis of the PCA on basis of the broken-stick method (Jackson, 1993;

Table 1: Effect of treatment on reproductive success and selection gradients on the different floral traits in both sexes.

	Estimates for females $R^2_S = 0.714$	P	Estimates for males $R^2_S = 0.266$	P
Treatment	0.079 ± 0.076	.30	-0.017 ± 0.127	.89
β Flower number	0.52 ± 0.051	<.001	0.15 ± 0.095	.13
β Flower number × Treatment	-0.044 ± 0.076	.57	0.27 ± 0.12	.027
β Gametes number per flower	0.31 ± 0.038	<.001	-0.027 ± 0.065	.68
β PC1	0.025 ± 0.039	.52	0.13 ± 0.065	.045

Notes: Estimates (± SE) from linear model are reported for treatment effect and selection gradients in both sexes. P-value in bold are significant. The proportion of variance explained by each model is reported using adjusted R-squared (R^2_S).

Figure SA4). In both sexes, this first axis mainly represents small versus large petals when checking the contributions of each trait.

Pollen dispersal distance - Variation in mean pollen dispersal distances among males was assessed using a linear model including as explanatory variables (i) the number of real flowers, (ii) the treatment (iii) interaction between the number of flower and treatment, (iv) the number of gametes per flower and (v) the first axis of PCA defined above. Prior weights were set to assess uncertainty of a posteri individual mean pollen dispersal distance of the MEMM model.

Patterns of selection on flower number - We explored the effect of the treatment on reproductive and mating success of males and females using ANCOVAs. We built two categories of linear models per sex (predicting either reproductive success or mating success), and using the following independent variables: treatment, number of real flowers, the interaction between these two variables, number of gametes per flower and the first axis of the PCA defined above. These models were constructed separately for each sex, and pollen dispersal distance were not included in male models to keep the same explanatory variables and compare effects between sexes. We accounted for uncertainties in the estimation of male reproductive success by modeling prior weights of a posteriori distributions of the MEMM model.

To provide estimates of selection gradients and mating gradients comparable between studies, we performed the analyses described above using relative reproductive success and standardized trait values, following standard recommendations (Lande and Arnold, 1983). We computed relative reproductive success (i) per sex and (ii) across treatment because (i) sex-specific estimation methods of reproductive success would have precluded any comparison in the strength of selection on specific traits and (ii) all individuals were in the same common garden (De Lisle and Svensson, 2017). Traits were also standardized within each sex. One male individual of the MT treatment produced much more flowers than others (70 flowers versus 19.02 on average). Analysis were conducted with and without this individual to verify robustness of our results: all patterns described below hold when removing this outlier.

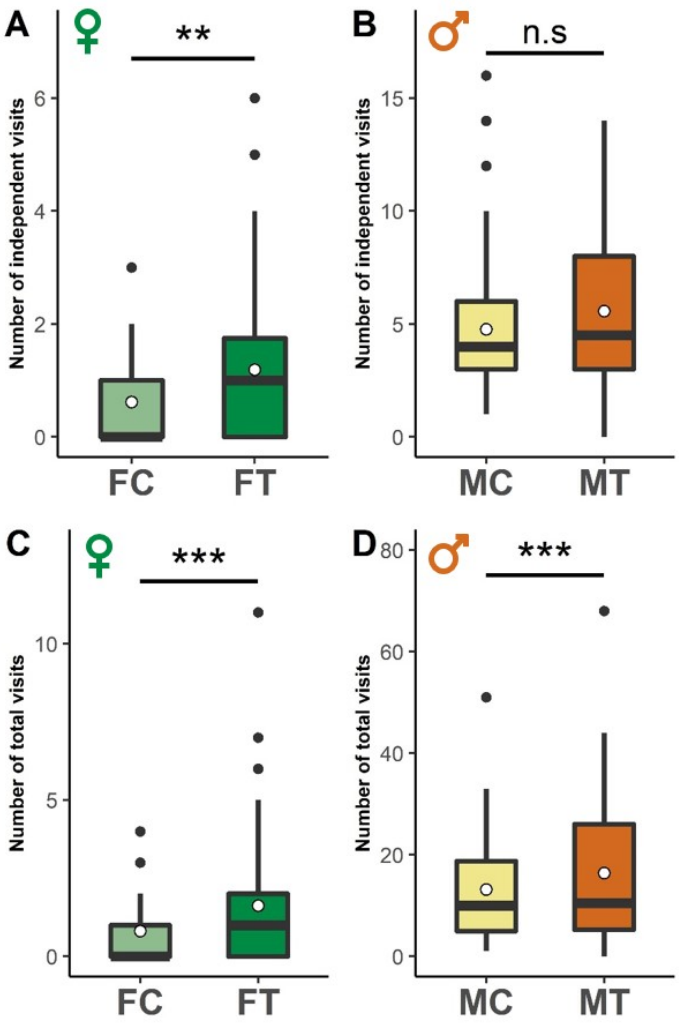


Figure 1: Boxplots representing the number of independent visits (A,B) and the number of total visits (C,D) by pollinators, according to treatment. Females (A,C) and males (B,D) are both more visited when dummy flowers are added (FT and MT groups). Means are represented with white points. *P*-values are represented with $\star\star < 0.01$ and $\star\star\star < 0.001$

Results

MANOVAs did not detect any phenotypic differences between treatments (females: $F_{1,81} = 0.769, P = .203$; males $F_{1,76} = 0.853, P = .760$), thus validating global homogeneity of floral traits across treatments.

No evidence for pollen limitation

We found no evidence of pollen limitation in our experimental garden. Hand-pollinated females (FHP) did not show larger seed-sets than open-pollinated females (FC and FT) as revealed by the non-significant effect of pollen supplementation (FC: 0.62 ± SE 0.012; FT: 0.65 ± SE 0.011; FHP: 0.59 ± SE 0.018; $\chi^2_{2,556} = 1.46, P = .48$).

Phenotypic manipulation increased pollinator visitation

A total of 280 pollinators were observed, including Syrphidae (60.7% of visitors), Bombus species (28.6%), Halictidae (6.8%) and Lepidopterae (3.%). Pollinators were more attracted by males than females as revealed by significant sex effects for all three descriptors of pollinator visitation patterns: binary visits ($\chi^2_{1,167} = 43.14, P < .001$), independent visits ($\chi^2_{1,167} = 151.97, P < .001$) and total visits ($\chi^2_{1,167} = 552.79, P < .001$; Figure 1). Dummy flowers marginally increased binary visits ($\chi^2_{1,167} = 3.07, P = .080$), and significantly increased both the number of independent and total visits ($\chi^2_{1,167} = 7.71, P < .01$ and $\chi^2_{1,167} = 11.55, P < .001$ respectively). The positive effect of dummy flowers on the number of total visits was more pronounced in females than in males as revealed by a significant interaction between sex and treatment ($\chi^2_{1,167} = 4.85, P = .028$; Figure 1). Moreover, the positive effect of dummy flowers on the number of independent visits was marginally more pronounced in females than in males ($\chi^2_{1,167} = 3.77, P = .052$). The effect of dummy flowers on independent visits was not significant in males ($\chi^2_{1,83} = 2.66, P = .10$).

Pollen dispersal distance was influenced by flower number

Across treatments, average pollen dispersal distance was 1.51 meters (± 0.32 SD) within our experimental garden. Mean pollen dispersal distance increased with the number of flowers produced by males ($F_{1,78} = 10.16, P < .01$), but did not depend on the treatment ($F_{1,78} = 0.0061, P = .94$), nor on the interaction between flower number and treatment ($F_{1,78} = 1.84, P = .18$; Figure SA5). Neither the number of gametes per flower nor PC1 (representing variation in petal sizes) affected pollen dispersal distance (respectively $F_{1,78} = 0.33, P = .57$; $F_{1,78} = 0.85, P = .36$).

Selection patterns differ between sexes

In females, flower number was positively associated with both reproductive and mating success (Table 1; Table 2; Figure 2). Treatment as a main effect affected neither reproductive (Table 1) nor mating success (Table 2). We detected positive selection and mating gradients on the number of gametes per flower (Table 1; Table 2; Figure 3). No difference was found in selection gradient on flower number between treatments (i.e. no effect of the interaction term concerning reproductive success; Figure 2). On the contrary, the significant interaction between flower number and treatment for mating success showed that control females had a steeper mating gradient on flower number than manipulated females, thus experiencing stronger sexual selection on flower number (i.e. the phenotypic manipulation decreased the effect of flower number on mating success; Figure 2).

Table 2: Effect of treatment on mating success and mating gradients estimation on the different floral traits in both sexes.

	Estimates for females $R^2_S = 0.552$	P	Estimates for males $R^2_S = 0.262$	P
Treatment	0.13 ± 0.072	.073	0.095 ± 0.11	.37
β Flower number	0.41 ± 0.048	<.001	0.22 ± 0.080	<.01
β Flower number x Treatment	-0.16 ± 0.072	.030	0.14 ± 0.11	.19
β Gametes number per flower	0.18 ± 0.036	<.001	0.036 ± 0.054	.51
β PC1	0.036 ± 0.036	.32	0.064 ± 0.053	.23

Notes: Estimates (± SE) from linear model are reported for treatment effect and mating gradients in both sexes. P-value in bold are significant. The proportion of variance explained by each model is reported using adjusted R-squared (R^2_S).

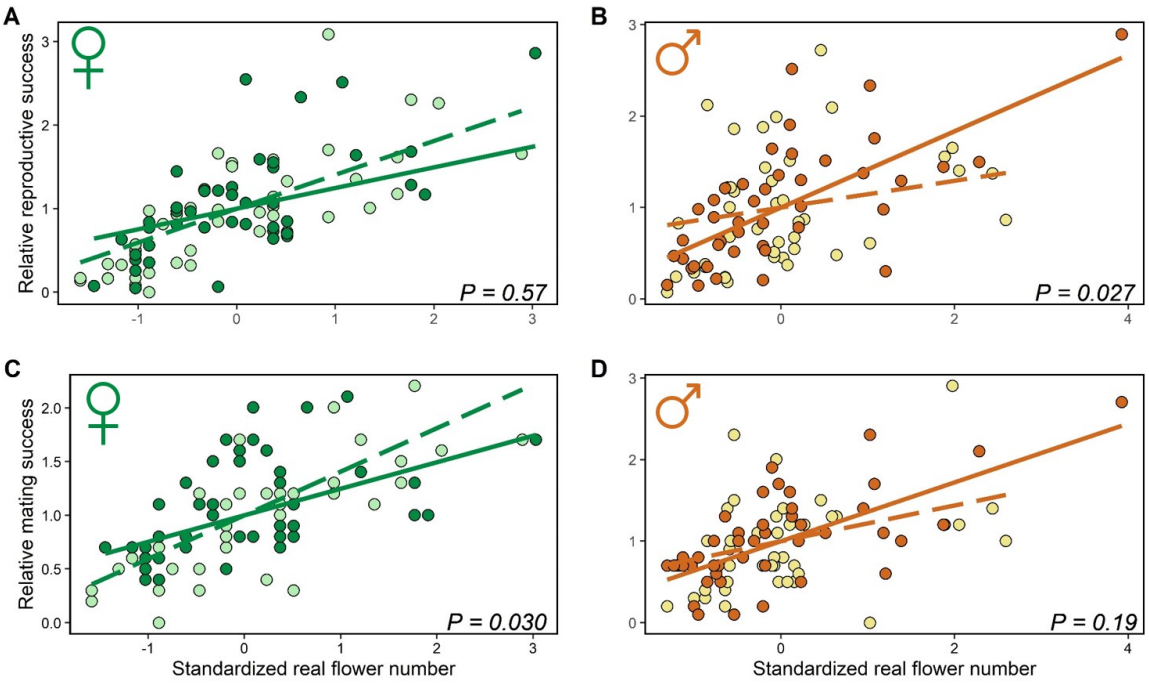


Figure 2: Relation between (i) reproductive success and flower number (A,B) and (ii) mating success and flower number (C,D) in each sex. Females are represented in green in the left panel (A,C) and males are represented in orange in the right panel (B,D). Individuals with unmanipulated phenotype (C) are represented with light circles and dashed lines, whereas individuals with artificially increased flower number (T) are represented with dark circles and solid lines. P-values from the effect of the interaction between the two treatments are represented on the bottom right side.

In males, we found no relationship between flower number and reproductive success, but flower number was positively associated with mating success (Table 1; Table 2; Figure 2). The treatment affected neither the reproductive ($F_{1,78} = 0.018, P = .89$; Table 1) nor the mating success ($F_{1,78} = 0.80, P = .37$; Table 2). There was positive selection gradient on petal size (i.e. indicated by PC1), but mating gradient on petal size was non-significant (Table 1; Table 2; Figure 3). Finally, we detected a significant effect of the interaction between flower number and treatment for reproductive success, with a positive selection gradient on flower number only in manipulated males (Figure 2).

Discussion

Sexual dimorphism for flower number is often observed in temperate animal-pollinated dioecious species, with males being typically more conspicuous (Eckhart, 1999). Historically, this difference in flower number between sexes has been considered as the consequence of a stronger selection through the male versus the female function, although this hypothesis has yet to be clearly confirmed by empirical data (Queller, 1983; Bell, 1985; Burd and Callahan, 2000; Skogsmyr and Lankinen, 2002). *Silene dioica* offers an example of such disparity with a six-fold average difference in daily flower number between sexes (Moquet et al., 2020; Barbot et al., in prep. A), but no selection on daily flower number in males when assessing reproductive and mating success over the whole flowering season (Barbot et al., in prep. A). In the current study, we aimed at estimating the effect of flower number on reproductive and mating success in males and females at the flowering peak using phenotypic manipulation. The purpose of artificially manipulating the number of flowers was to disentangle its effect in terms of attractiveness from that on gamete production on both reproductive and mating success. Such phenotypic manipulation allowed us to verify that the addition of dummy flowers indeed increased pollinator attraction in both sexes, although its effect was apparently stronger in females. Males with additional dummy flowers did not receive a higher number of independent visits compared to controls. However, because the total number of visits was positively impacted by the treatment, this suggests that more flowers were visited in manipulated males, possibly increasing the quantity of pollen exported by pollinators.

Female reproductive success is mainly driven by gamete production

Our sex-specific selection gradient analysis of the control group converged with our previous findings in *Silene dioica* by showing that females are under positive selection for flower number, whereas males are not (Barbot et al., in prep. A). Given that the positive effect of flower number in females was similar in manipulated and control plants, we can conclude that it solely stems from fertility selection, as reported in other studies (Sandring and Ågren, 2009; Delph and Herlihy, 2012; Chen et al., 2017). This is also consistent with the absence of pollen limitation found in the current study: female reproductive success was not limited by pollen and thus by their access to pollinators.

We also detected a positive effect of flower number on mating success in control females. Producing more flowers implies that more ovules are available for fertilization; assuming that pollen carried by pollinators originates from different potential sexual partners, an increase in flower production should increase the number of sexual partners. Unexpectedly, we also found that the addition of dummy flowers reduced selection on flower number through mating success. If manipulated females received a higher total number of visits, as suggested by pollinators observations, this implies that several flowers were visited by the same insect more often in females with dummy flowers. Our results thus suggest that a limited number of pollinators are sufficient to saturate all receptive stigmas on a female,

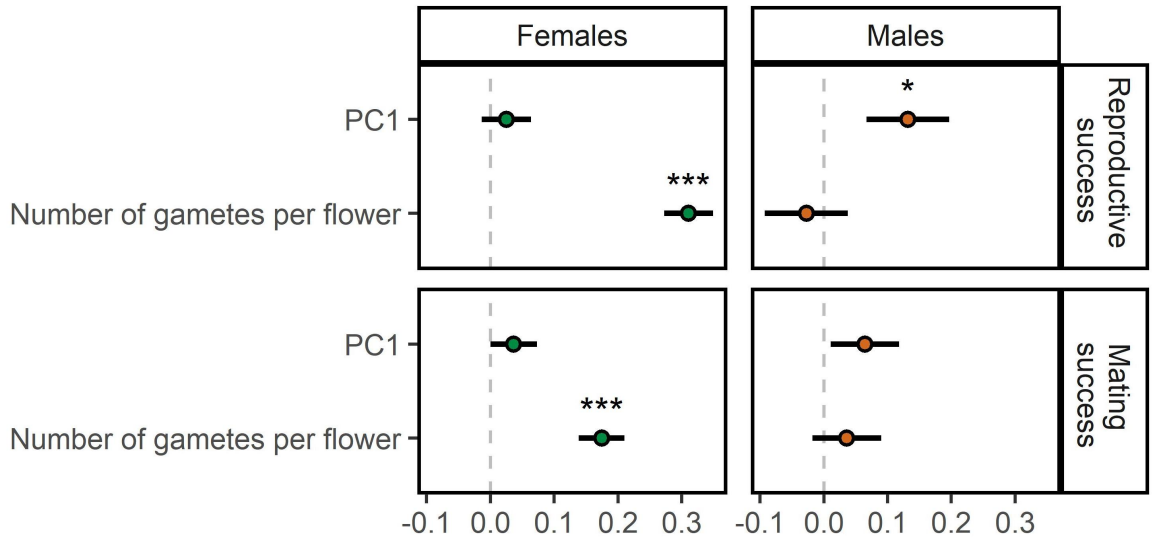


Figure 3: Selection and mating gradients on the number of gametes per flower and PC1 (low values mean small petals, high values mean large petals), in both sexes. Significance of selection gradients are indicated with stars ($\star$ $P < .05$; $\star\star$ $P < .01$; $\star\star\star$ $P < .001$).

thus limiting the number of unfertilized ovules remaining for potential future sires (Bell, 1985). Future studies should explore the implications of pollen limitation context for sexual selection acting on flower number.

Pollen export enhances male reproductive success

Some of our results point towards an effect of pollinator attraction rather than gamete production on male flower production. Indeed, we identified a positive effect of flower number on mating success in control males, which could be driven both by a greater pollinator attraction and/or by higher pollen production at the individual level. Moreover, sexual selection for larger petals in males (represented by the first axis of PCA on floral traits in our analysis) could also be under pollinator-mediated selection, as this trait is often attractive for pollinators (Stanton et al., 1991; Conner and Rush, 1996; Barrio and Teixido, 2015).

Whereas we found evidence for sexual selection on flower number in this study, this was not the case in our previous investigations of this species. Such discrepancy may simply originate from differences in the temporal window of sampling between the two studies. In Barbot et al. (in prep. A), selection gradients were estimated across the whole flowering season, and revealed a strong positive effect of flowering duration on mating success. As producing more flowers is achieved by flowering longer, the positive effect of flower number on mating success might have been masked by the correlation between these two traits in our previous study. Here, we estimated selection gradient on a shorter temporal window, in which all male and female plants were flowering at the same time. Enhancing mating success could then just be achieved by spatial mate acquisition, instead of temporal mate acquisition by increasing flowering synchrony. Accordingly, producing more flowers allowed males to disperse their pollen further, although adding dummy flowers did not increase pollen dispersal distance, nor mating success. This results may indicate that pollen production increases the number of

sexual partners by impacting the quantity of pollen deposited on pollinators' bodies and thus enhancing pollen deposition on female's stigmas. Interestingly, our results extend for an insect-pollinated plant, the previous findings that the spatial exploration of mating prospects promotes the access to sexual partners, either through male plant architectures fostering pollen dispersal through wind in an angiosperm species (Tonnabel et al., 2019a,b) or through clonal growth in a pet moss (Johnson and Shaw, 2016).

Using phenotypic manipulation, we found that manipulated males experienced stronger selection on flower number compared to control males, despite their similar pollen production. Given that our pollinator observations showed that adding dummy flowers enhanced at least the number of flowers visited by each pollinator, males with greater (and partially fake) floral display might have benefited from an increase in pollen removal allowing them to fertilized more ovules. This effect of dummy flowers raises the question of why we did not detect a positive effect of flower number in control males (similarly as reported in Barbot et al., in prep. A). Indeed, if attracting more pollinators is advantageous in terms of reproductive success, one could expect selection for flower number in the control group too. We here speculate that the adding of dummy flowers allows achieving non-reachable values of the fitness landscape, by optimizing pollen export through pollinator attraction and thus strengthening selection on flower number.

Conclusion

Here, we demonstrated that the manipulation of flower number has sex-specific effects. In males, we reported stronger overall selection on flower number when dummy flowers were added. On the contrary, we observed weaker sexual selection on flower number in females when dummy flowers were added.

Our results are partially congruent with the male-function hypothesis (Bell, 1985), yet in a non-monotonous way. Whereas selection on flower number in females appears to be only related to fertility selection, pollinator mediated selection may occur on the same trait in males. Males with extreme phenotypes experience more pollinators visits and could then benefit from producing many (real) flowers and pollen grains. This implies that both fertility and pollinator mediated selections could play a role in the evolution of flower number in males. On the contrary, we found that artificial increase in pollinator attraction had no impact on mating success or mating gradients. It remains an open question as to whether pollinator behavior can contribute to the reported association between mating success and traits. In particular, pollinators carrying more pollen on their body may efficiently deposit pollen on more females. Flower number, by increasing attractiveness and pollen removal, could then have an effect on mating success.

In females, producing more flowers without producing more gametes seems to decrease the number of mates. In our experimental study, such decrease in the number of mates did not translate into a decrease in reproductive success. One interesting perspective of the current study would be to investigate whether the possible conflicting effects of flower number on female reproductive and mating success depends on pollen availability in the wild (Dai and Galloway, 2013). While the male function hypothesis could explain the excess number of flowers in males, the potential drawback of producing a lot of flowers under pollen limitation could explain the few flower number in females.

Acknowledgments

We would like particularly to thank E. Klein for letting us access the MEMM model. We thank S. P. De Lisle for precious advices about reproductive and mating success relativization and traits standardization in selection gradient analysis. For laboratory and greenhouse assistance, we thank C. Gode, L. Debacker, S. Flourez, N. Le Roux and E. Schmitt.

Funding

This work is a contribution to the CPER research project CLIMIBIO. The authors thank the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Hauts de France Region and the European Funds for Regional Economical Development for their financial support to this project. JT was funded by a Marie-Sklodowska-Curie grant (#844321).

References

Arnold, S. J. (1994). Bateman's principles and the measurement of sexual selection in plants and animals. *The American Naturalist*, 144:S126–S149.

Ashman, T.-L. and Morgan, M. T. (2004). Explaining phenotypic selection on plant attractive characters: male function, gender balance or ecological context? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271:553–559.

Ashman, T.-L. and Stanton, M. (1991). Seasonal variation in pollination dynamics of sexually dimorphic *Sidalcea oregana* ssp. *spicata* (Malvaceae). *Ecology*, 72:993–1003.

Baker, H. G. (1947). *Melandrium dioicum* (L. emend) Coss. & Germ. *Journal of Ecology*, 35:283–292.

Barbot, E., Dufaÿ, M., and De Cauwer, I. (in prep. A). Natural and sexual selection in an insect-pollinated plant.

Barrett, S. C. H. and Hough, J. (2012). Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany*, 64:67–82.

Barrio, M. and Teixido, A. L. (2015). Sex-dependent selection on flower size in a large-flowered Mediterranean species: an experimental approach with *Cistus ladanifer*. *Plant Systematics and Evolution*, 301:113–124.

Bateman, A. J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2:349–368.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., and Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using *lme4*. *Journal of Statistical Software*, 67:1–48.

Bell, G. (1985). On the function of flowers. *Proceedings of the Royal Society of London*, 224:223–265.

Brooks, S. P. and Gelman, A. (1998). General methods for monitoring convergence of iterative simulations. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 7:434–455.

Broyles, S. B. and Wyatt, R. (1990). Paternity analysis in a natural population of *Asclepias exaltata*: multiple paternity, functional gender, and the "pollen-donation hypothesis". *Evolution*, 44:1454–1468.

Burd, M. (1994). Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. *The Botanical Review*, 60:83–139.

Burd, M. and Callahan, H. S. (2000). What does the male function hypothesis claim? *Journal of Evolutionary Biology*, 13:735–742.

Campbell, D. R. (2009). Using phenotypic manipulations to study multivariate selection of floral trait associations. *Annals of Botany*, 103:1557–1566.

Caruso, C. M., Eisen, K. E., Martin, R. A., and Sletvold, N. (2019). A meta-analysis of the agents of selection on floral traits. *Evolution*, 73:4–14.

Chen, L., Zhang, B., and Li, Q. (2017). Pollinator-mediated selection on flowering phenology and floral display in a distylous herb *Primula alpicola*. *Scientific Reports*, 7:13157.

Chittka, L. and Thomson, J. D. (2001). Behavioral responses of pollinators to variation in floral display size and their influences on the evolution of floral traits. In *Cognitive ecology of pollination - animal behavior and floral evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.

Conner, J. K. and Rush, S. (1996). Effects of flower size and number on pollinator visitation to wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia*, 105:509–516.

Conner, J. K., Rush, S., Kercher, S., and Jennetten, P. (1996). Measurements of natural selection on floral traits in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). II. Selection through lifetime male and total fitness. *Evolution*, 50:1137–1146.

Cothran, R. D., Kuzmic, A., Wellborn, G. A., and Relyea, R. A. (2010). Phenotypic manipulation provides insights into the function of a sexually selected trait in a freshwater crustacean species complex. *Animal Behaviour*, 80:543–549.

Cuartas-Domínguez, M. and Medel, R. (2010). Pollinator-mediated selection and experimental manipulation of the flower phenotype in *Chloraea bletioides*. *Functional Ecology*, 24:1219–1227.

Dai, C. and Galloway, L. F. (2013). Sexual selection in a hermaphroditic plant through female reproductive success. *Journal of Evolutionary Biology*, 26:2622–2632.

Darwin, C. (1871). *The descent of man, and selection in relation to sex*. John Murray, London.

De Lisle, S. P. and Svensson, E. I. (2017). On the standardization of fitness and traits in comparative studies of phenotypic selection. *Evolution*, 71:2313–2326.

Delph, L. F. and Herlihy, C. R. (2012). Sexual, fecundity, and viability selection on flower size and number in a sexually dimorphic plant. *Evolution*, 66:1154–1166.

Dufaÿ, M., Vaudey, V., De Cauwer, I., Touzet, P., Cuguen, J., and Arnaud, J.-F. (2008). Variation in pollen production and pollen viability in natural populations of gynodioecious *Beta vulgaris* ssp. *maritima* : evidence for a cost of restoration of male function? *Journal of Evolutionary Biology*, 21:202–212.

Eckhart, V. M. (1999). Sexual dimorphism in flowers and inflorescences. In *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin.

Fernández-i Marín, X. (2016). ggmcmc: Analysis of MCMC samples and bayesian inference. *Journal of Statistical Software*, 70:1–20.

Hodges, S. A. (1995). The influence of nectar production on hawkmoth behavior, self-pollination, and seed production in *Mirabilis multiflora* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany*, 82:197–204.

Hodgins, K. A. and Barrett, S. C. H. (2008). Natural selection on floral traits through male and female function in wild populations of the heterostylous daffodil *Narcissus triandrus*. *Evolution*, 62:1751–1763.

Jackson, D. A. (1993). Stopping rules in principal components analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches. *Ecology*, 74:2204–2214.

Jalas, J. and Suhominen, J. (1986). *Atlas florae europaeae: distribution of vascular plants in Europe. 7. Caryophyllaceae (Silenoideae)*. Cambridge University Press, Cambridge.

Janicke, T., Häderer, I. K., Lajeunesse, M. J., and Anthes, N. (2016). Darwinian sex roles confirmed across the animal kingdom. *Science Advances*, 2:e1500983.

Jennions, M. D. and Kokko, H. (2010). Sexual selection. In *Evolutionary behavioral ecology*. Oxford University Press, Oxford.

Johnson, M. G. and Shaw, A. J. (2016). The effects of quantitative fecundity in the haploid stage on reproductive success and diploid fitness in the aquatic peat moss *Sphagnum macrophyllum*. *Heredity*, 116:523–530.

Kalinowski, S. T., Taper, M. L., and Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16:1099–1106.

Katayama, N., Abbott, J. K., Kjærandsen, J., Takahashi, Y., and Svensson, E. I. (2014). Sexual selection on wing interference patterns in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111:15144–15148.

Kay, Q. O. N., Lack, A. J., Bamber, F. C., and Davies, C. R. (1984). Differences between sexes in floral

morphology, nectar production and insect visits in a dioecious species, *Silene dioica*. *New Phytologist*, 98:515–529.

Knight, T. M., Steets, J. A., Vamosi, J. C., Mazer, S. J., Burd, M., Campbell, D. R., Dudash, M. R., Johnston, M. O., Mitchell, R. J., and Ashman, T.-L. (2005). Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36:467–497.

Lande, R. and Arnold, S. J. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 37:1210–1226.

Levitan, D. R. (2010). Sexual selection in external fertilizers. In *Evolutionary behavioral ecology*. Oxford University Press, Oxford.

Lloyd, D. G. and Webb, C. J. (1977). Secondary sex characters in plants. *The Botanical Review*, 43:177–216.

Maia, R., Gruson, H., Endler, J. A., and White, T. E. (2019). *pavo2*: New tools for the spectral and spatial analysis of colour in R. *Methods in Ecology and Evolution*, 10:1097–1107.

Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B., and Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7:639–655.

Ming, R., Bendahmane, A., and Renner, S. S. (2011). Sex chromosomes in land plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62:485–514.

Moore, A. J. and Moore, P. J. (1999). Balancing sexual selection through opposing mate choice and male competition. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266:711–716.

Moore, J. C. and Pannell, J. R. (2011). Sexual selection in plants. *Current Biology*, 21:R176–R182.

Moquet, L., Lateur, L., Jacquemart, A.-L., De Cauwer, I., and Düfay, M. (2020). Temporal dynamics of sexual dimorphism in a dioecious species. *Annals of Botany*, 126:471–480.

Morgan, M. T. (1994). Models of sexual selection in hermaphrodites, especially plants. *The American Naturalist*, 144:S100–S125.

Mori, E., Mazza, G., and Lovari, S. (2017). Sexual dimorphism. In *Encyclopedia of animal cognition and behavior*. Springer International Publishing, Cham.

Oddou-Muratorio, S., Gauzere, J., Bontemps, A., Rey, J.-F., and Klein, E. K. (2018). Tree, sex and size: ecological determinants of male vs. female fecundity in three *Fagus sylvatica* stands. *Molecular Ecology*, 27:3131–3145.

Ollerton, J., Winfree, R., and Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120:321–326.

Pau, G., Fuchs, F., Sklyar, O., Boutros, M., and Huber, W. (2010). *EBImage* - an R package for image processing with applications to cellular phenotypes. *Bioinformatics*, 26:979–981.

Pellegrino, G., Bellusci, F., and Palermo, A. M. (2017). Functional differentiation in pollination processes among floral traits in *Serapias* species (Orchidaceae). *Ecology and Evolution*, 7:7171–7177.

Queller, D. C. (1983). Sexual selection in a hermaphroditic plant. *Nature*, 305:706–707.

Safran, R. J., Vortman, Y., Jenkins, B. R., Hubbard, J. K., Wilkins, M. R., Bradley, R. J., and Lotem, A. (2016). The maintenance of phenotypic divergence through sexual selection: An experimental study in barn swallows *Hirundo rustica*. *Evolution*, 70:2074–2084.

Sahli, H. F. and Conner, J. K. (2011). Testing for conflicting and nonadditive selection: floral adaptation to multiple pollinators through male and female fitness. *Evolution*, 65:1457–1473.

Sandring, S. and Ågren, J. (2009). Pollinator-mediated selection on floral display and flowering time in the perennial herb *Arabidopsis lyrata*. *Evolution*, 63:1292–1300.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9:671–675.

Skogsmyr, I. and Lankinen, Å. (2002). Sexual selection: an evolutionary force in plants? *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 77:537–562.

Stanton, M., Young, H. J., Ellstrand, N. C., and Clegg, J. M. (1991). Consequences of floral variation for male and female reproduction in experimental populations of wild radish, *Raphanus sativus* I. *Evolution*, 45:268–280.

Sutherland, S. and Delph, L. F. (1984). On the importance of male fitness in plants: patterns of fruit-set.

Ecology, 65:1093–1104.

Tonnabel, J., David, P., Klein, E. K., and Pannell, J. R. (2019a). Sex-specific selection on plant architecture through "budget" and "direct" effects in experimental populations of the wind-pollinated herb, *Mercurialis annua*. *Evolution*, 73:897–912.

Tonnabel, J., David, P., and Pannell, J. R. (2019b). Do metrics of sexual selection conform to Bateman's principles in a wind-pollinated plant? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286:20190532.

Trivers, R. (1972). Parental investment and sexual selection. In *Sexual selection and the descent of man*, pages 136–179. Aldine DeGruyter, New York.

Trunschke, J., Sletvold, N., and Ågren, J. (2017). Interaction intensity and pollinator-mediated selection. *New Phytologist*, 214:1381–1389.

van Kleunen, M. and Burczyk, J. (2008). Selection on floral traits through male fertility in a natural plant population. *Evolutionary Ecology*, 22:39–54.

Warmke, H. E. (1946). Sex determination and sex balance in *Melandrium*. *American Journal of Botany*, 33:648–660.

Westerbergh, A. and Saura, A. (1994). Gene flow and pollinator behaviour in *Silene dioica* populations. *Oikos*, 71:215–224.

Supplementary material

Appendix A

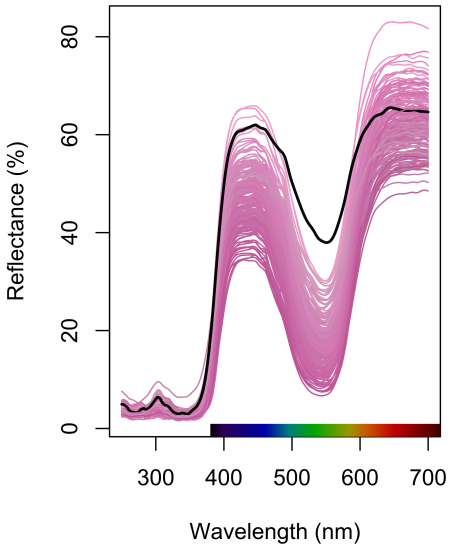


Figure SA1: Reflectance (%) according to wavelength for petals and crepe paper used to make dummy flowers. Reflectance from all individuals used in this experiment are shown in pink, and reflectance of crepe paper is shown in black.

Figure SA2: Fake flower in crepe paper compared to real *Silene dioica* flowers, which present color polymorphism.

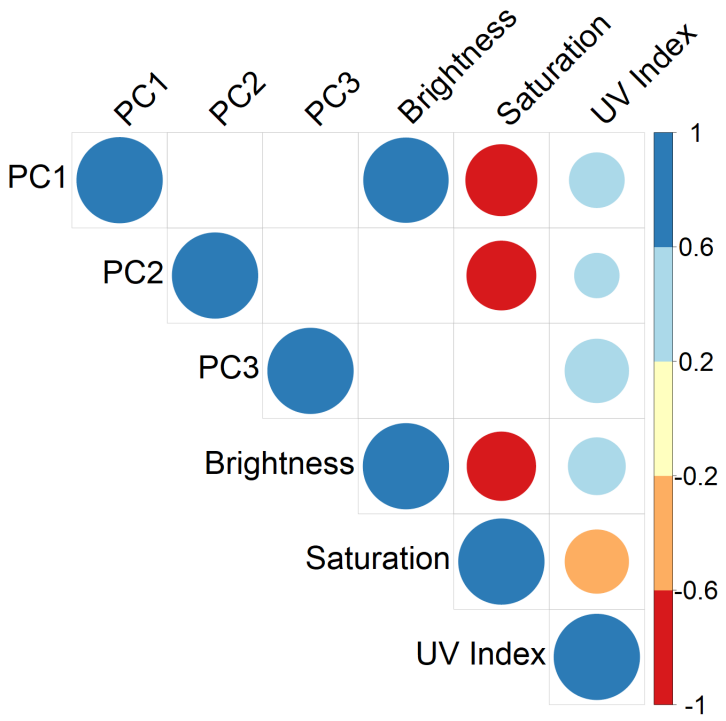


Figure SA3: Pearson correlation indexes between (i) the three first axis of Principal Component Analysis on petal reflectance (which explain respectively 55.4%, 36.6% and 5.4% of total variance), (ii) luminance, (iii) saturation and (iv) UV Index. Only correlations significant after Bonferroni corrections are represented.

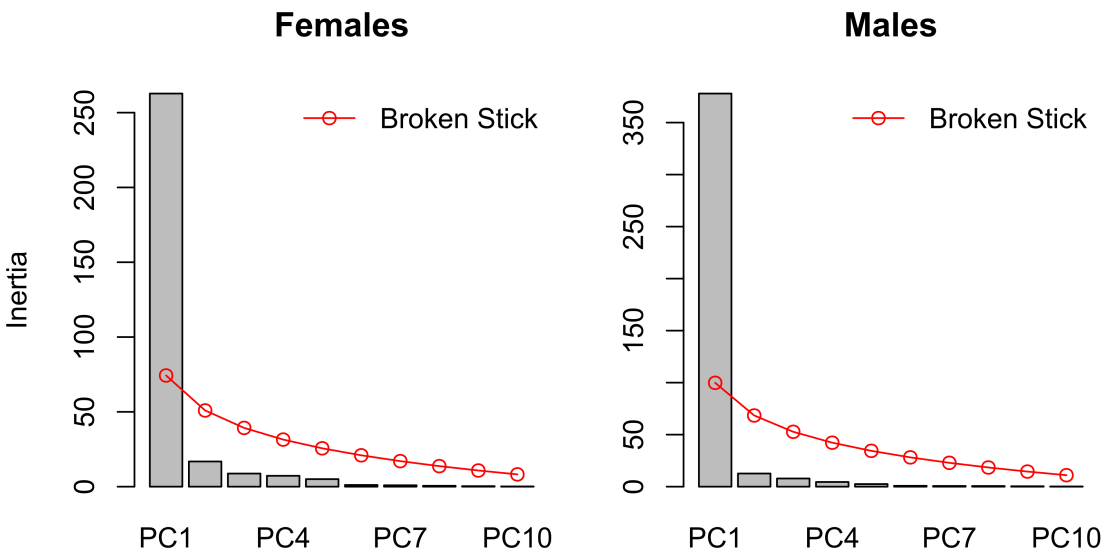


Figure SA4: Dataset inertia explained by the ten first principal components of Principal Component Analysis on all attractive floral traits measured except flower number, for females (left) and males (right). The red lines represent expected inertia if the variance were randomly divided into the ten first components, according to the broken-stick model (Jackson, 1993). Only components that explain more variance than the broken-stick model are retained, here only the first Principal Component PC1.

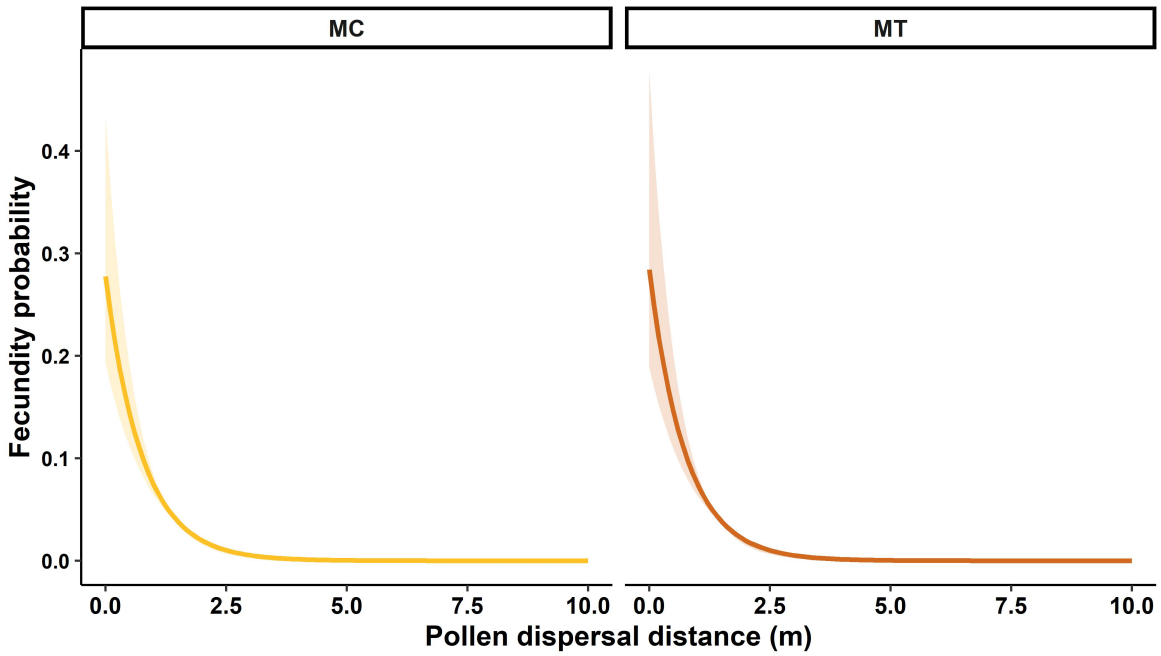


Figure SA5: Pollen dispersal kernel for control males (MC, left) and manipulated males (MT, right).

Reference

Jackson D.A. (1993). Stopping rules in principal components analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches. *Ecology*, 74:2204–2214.

Appendix B

Text SB1: Robustness analysis for estimating female mating success

We repeated our analyses using a method for mating success estimation based on a resampling of genotyped seedlings non-proportional to the mother's fertility (i.e. seed production). This allowed us to test for the robustness of our results using an estimator of mating success independent of the mother's seed production (i.e. in which the number of mates is explored on the same number of genotyped progeny for each female within our experimental populations).

As described in the main text, the number of seedlings genotyped per female was proportional to the female reproductive success (i.e. prorata number method), such that a female with a low reproductive success relative to more fecund females would end up with a lower number of genotyped seedlings in our dataset. The rationale for using this method was to account for the fertility of the female partner in the estimation of male reproductive success, such that males that sired seeds on the most fecund females would end up having a greater number of genotyped seedlings in the resulting dataset. Indeed, when setting up our experiment and genotyping our seed in 2019, we had initially foreseen to use categorical methods of paternity assignments for which such correction of the female partner's fertility is needed. Very recent developments of estimation of variance in male reproductive success through modeling of mating events allowed taking into account the female partner's fertility independently from the method of seed sampling, i.e. the proportion of seeds sired by a given male – its paternity share – on each female is effectively weighted by the female fertility (taken as an input data) to estimate male reproductive success.

While sampling seedlings through the prorata method does not introduce any bias in this male reproductive success estimation through the MEMM, it does elicit an artificial correlation between the number of seeds produced and the maximum number of mates one can estimate on a given female. In addition, because reproductive success and flower number are correlated in females in our study species, this could also have elicited an artificial correlation between flower number and estimated mating success. Thus, any trait positively linked to female reproductive success should ultimately become artificially linked to female mating success as a consequence of the 'prorata' seed sampling strategy.

The 'prorata' method also may induce a bias in male mating success estimation in case of a form of assortative mating where certain males would manage to sire ovules on more fecund female partners but would actually mate with the same number of female partners than males mating with less fecund females. The 'prorata' method would then explore mating partners on a greater number of seedlings for males mating with more fecund partners. It is therefore also needed to estimate potential biases of this method on our results on male mating success.

To estimate the potential biases associated with the 'prorata' method, we re-iterated our analyses by sampling a fixed number of seedlings per female (i.e. 'fixed' number method). The fixed number used for sampling within each female' offspring was defined according to the lowest number of genotyped seedlings per female L, with $L = 5$ seedlings. Using $N = 1000$ simulations , we resampled L seedlings within each female's offspring. Such bootstrap analysis allows to provide an unbiased estimator of mating success while retaining all the genotyped data produced. At each simulation n, the number of different sexual partners s which was assigned for a particular father/mother was computed (s_n). At the end of the simulations, s_n was averaged for each plant over the 1000 simulations. We further used this unbiased estimator to re-analyse the data.

Our findings of a positive relationship between female mating success and flower number were robust to the use of this unbiased estimator of mating success (Figure SB1 and Table SB1). In our robustness analysis we still found a positive mating gradient on flower number in the control group with unmanipulated flower number ($\beta = 0.091, P < .001$) and the difference between treatments in relationship between mating success and flower number became marginally significant ($P = 0.076$). All results regarding the relationship between mating success and flower number in males were robust to the use of the unbiased mating success estimator (Figures SB1 and SB2 and Table SB1).

Concerning re-analysis of mating gradients on covariables expressing plant morphology (PC1 and number of gametes per flower), all results were also robust to the use of the unbiased estimator of mating success except for the positive effect of the number of gametes per flower on female mating success which is no longer different from zero ($\beta = 0.002, P = 0.921$).

Table SB1: Re-analysis on mating success. Effect of treatment on mating success and mating gradients estimation on the different floral traits in both sexes

	Estimates for females $R^2_S = 0.552$	P	Estimates for males $R^2_S = 0.262$	P
Treatment	0.064 ± 0.031	.040	0.060 ± 0.11	.58
β Flower number	0.091 ± 0.020	<.001	0.28 ± 0.081	<.01
β Flower number × Treatment	-0.055 ± 0.031	.076	0.11 ± 0.11	.31
β Gametes number per flower	0.015 ± 0.015	0.92	0.044 ± 0.054	.41
β PC1	0.0066 ± 0.016	.67	0.045 ± 0.054	.41

Note: Estimates (± SE) from linear model are reported for treatment effect and mating gradients in both sexes. P-value in bold are significant. The proportion of variance explained by each model is reported using adjusted R-squared (R^2_S).

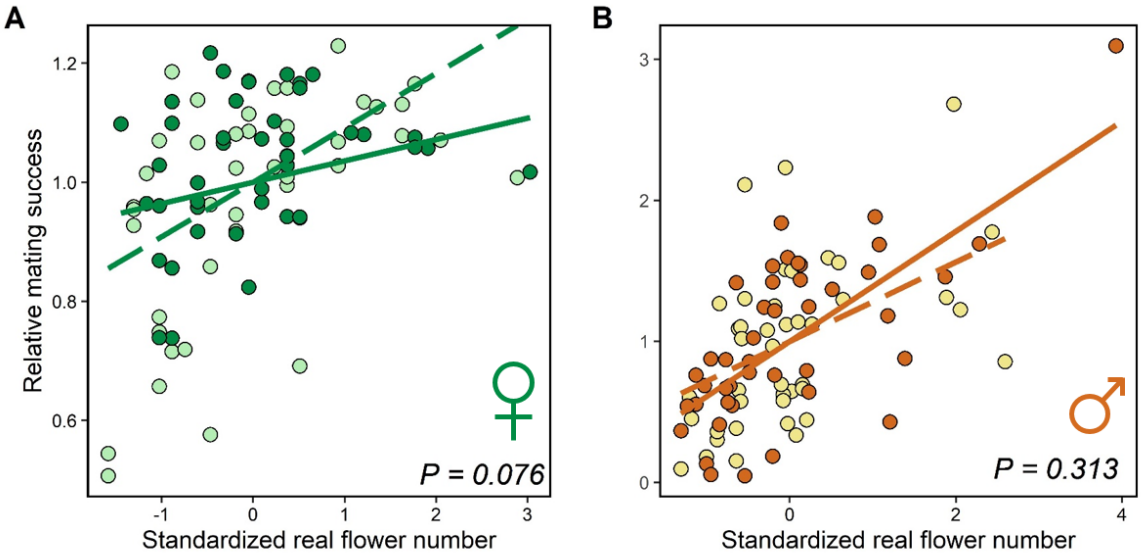


Figure SB1: Re-analysis on mating success: relation between mating success and flower number in each sex. Females are represented in green in the left panel (A) and males are represented in orange in the right panel (B). Individuals with unmanipulated phenotype (C) are represented with light circles and dashed lines, whereas individuals with artificially increased flower number (T) are represented with dark circles and solid lines. *P*-values from the effect of the interaction between the two treatments are represented on the bottom right side.

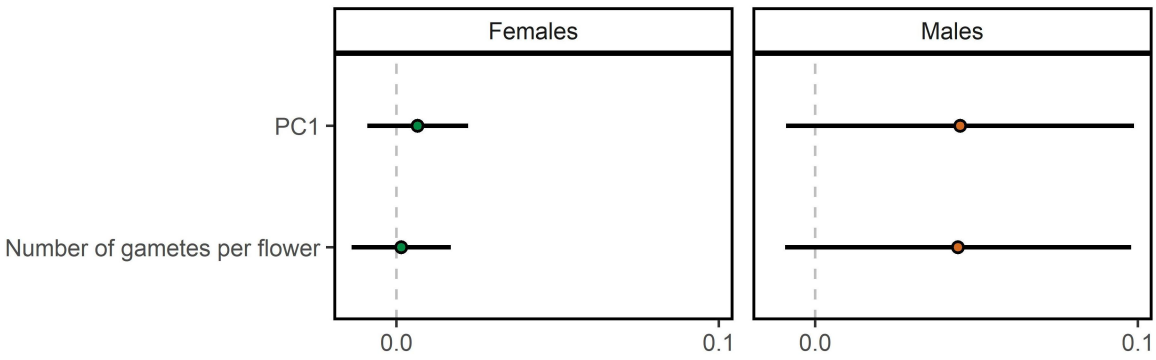


Figure SB2: Re-analysis on mating success : mating gradients on the number of gametes per flower and PC1 (low values mean small petals, high values mean large petals), in both sexes. Significance of selection gradients are indicated with stars ($\star$ $P < .05$; $\star\star$ $P < .01$; $\star\star\star$ $P < .001$).

- Manuscript C -

Exploring the effect of scent emission and exposition to diurnal versus nocturnal pollinators on selection patterns on floral traits

Estelle Barbot[1,3], Mathilde Dufaÿ[2] and Isabelle De Cauwer[1]

Authors affiliation:
[1] Univ. Lille, CNRS, UMR 8198 - Evo-Eco-Paleo, F-59000 Lille, France
[2] CEFE, Univ Montpellier, CNRS, Univ Paul Valéry Montpellier 3, EPHE, IRD, Montpellier, France
[3] Corresponding author: Estelle Barbot, E-mail: estelle.barbot@protonmail.com

In preparation

Contents

Abstract 143
Introduction 145
Material and Methods 147
Study system and plant material 147
Experimental population and common garden 147
Experimental treatments 147
Estimating pollen limitation 148
Measuring floral traits 148
Pollinator observations 149
Estimation of predation 149
Female reproductive success 149
Male reproductive success 149
Statistical analysis 150
Results 152
No pollen limitation but an increase in nocturnal fruit predation with PAA 152
PAA increased total number of pollinator visits on males during the day 152
No effect of exclusion and PAA treatments on reproductive success . 152
Selection gradients differ between treatments 154
Nocturnal pollinators disperse pollen further 154
Discussion 154
No occurrence of pollen limitation during day and night 154
Sex-specific selection on floral traits according to pollinators and PAA emission 156
Nocturnal pollinators disperse pollen further 157
Conclusion 158
Bibliography 159
Supplementary materials 163

Abstract

Plant species with mixed pollination system are under pollinator-mediated selection both by diurnal and nocturnal pollinator species. This could impact the strength and potentially direction of selection on floral traits, as different pollinators are not necessarily attracted by the same traits. In this study, we investigated how selection gradients on floral traits in *Silene dioica* were affected by (i) pollinator community the plants were exposed to (diurnal versus nocturnal pollination) and (ii) emission level of a volatile organic compound typically linked to pollinator attraction (natural versus enhanced phenylacetylaldehyd - PAA - emission) in a fully crossed design. Female plants in all treatments achieved full seed set, suggesting no difference in pollination efficiency between diurnal and nocturnal pollinator communities in *S. dioica*. Nocturnal pollination resulted in stronger selection on corolla width and calyx heighy in males, but only on calyx height in females. We further found that increased PAA emission modified selection on attractive traits both in plants exposed to diurnal and nocturnal pollinators, with a stronger effect in males. This stronger response of selection patterns to pollinator community and scent emission could suggest that males are more dependent on pollinator attraction than females in their reproductive success.

Key words: selection gradient - sex-specific - phenylacetaldehyd - exclusion - *Hadena bicruris*

Introduction

Coevolution between plants and their pollinators is believed to be a major driver of floral traits diversification in animal-pollinated angiosperms (Darwin, 1862; Fenster et al., 2004; Harder and Johnson, 2009). The increasing number of experimental studies evidencing the occurrence of pollinator-mediated selection on floral traits (Caruso et al., 2019), along with studies linking pollination mode to floral diversification in a phylogenetic framework (e.g. Graham and Barrett, 2004; Whittall and Hodges, 2007) strongly support this driving role of plant-pollinator interactions in shaping floral evolution. It should be noted, however, that only a minority of plant species have highly specialized pollination systems: for instance plants that are engaged in brood-site mutualisms (e.g. Pellmyr, 1992), or plants that rely on sexual mimicry to attract their pollinators (e.g. Peakall et al., 2010). Indeed, studies documenting pollinator assemblages often show that plant species are visited by multiple potential pollinator taxa (Zhang, 2017; Koto, 2019), and the relative role of each visitor as selective agent is generally not clear. This role is likely to depend on several parameters of the plant-pollinator interaction, in particular (i) the relative abundance of that pollinator in the local community, (ii) its visitation rate and pollination efficiency, as well as (iii) the effect that floral traits have on its visitation rate and pollination efficiency. Indeed, different pollinator species can differ in the floral traits that are used as attractive signals (Schemske and Bradshaw, 1999), or differ in their preference for a given trait value (Hoballah et al., 2007; Gong and Huang, 2009).

In this regard, plants with mixed pollination systems, i.e. plants that are pollinated both during day and night, constitute fascinating study objects, because diurnal and nocturnal pollinators are not necessarily attracted by the same signals. In particular, it is generally expected that visual signals should be crucial to attract diurnal pollinators, while fragrance should be more important for nocturnal pollinators (Fenster et al., 2004). For example, nocturnal hawkmoths have been shown to be mainly attracted by olfactory cues, whereas diurnal hawkmoths seem to be preferentially attracted by visuals cues (Balkenius et al., 2006). In plants with mixed pollination systems, overall selection on floral traits will thus be the product of different selection pressures mediated by diurnal versus nocturnal pollinators, reflecting their preferences for certain floral traits (Wu et al., 2018; Caruso et al., 2019). Exclusion experiments, where plants are exposed to only one type of pollinator, have confirmed that nocturnal and diurnal pollinator assemblages could have different effects on plant reproductive success (Giménez-Benavides et al., 2007; Stone and Olson, 2018; Vanderplanck et al., 2020) and demonstrated that the type of pollinators that have access to the plants could impact the strength of pollinator-mediated selection on floral traits (Sletvold et al., 2012).

In dioecious plant species, the effect of diurnal versus nocturnal pollinators on floral trait evolution could further differ between sexes. In *Silene latifolia* for instance, both diurnal and nocturnal pollinators prefer large floral displays, which are typically associated with males (Shykoff and Bucheli, 1995). In *Silene dioica*, the same pattern occurs with diurnal pollinators being more attracted by males, mostly because of their larger floral display (Moquet et al., in prep.). In another study, no positive selection was detected on daily flower number in males, although manipulated male plants, with an exaggerated floral display seemed to increase their reproductive success through pollinator attraction (Barbot et al., in prep. B). Because these results were found on plants exposed to potential pollinators during both day and night, the question of the relative strength and direction of selective pressures mediated by diurnal versus nocturnal pollinators and whether this differs between males and females remains open.

Pollination systems have been widely studied in the *Silene* genus, and species have traditionally been described as either nocturnal, diurnal or mixed based on their floral traits and on the circadian rhythm at which their flowers are open (Greuter, 1995; Jürgens et al., 1996; Prieto-Benítez et al., 2015). In that genus, the supposed pollination system can vary even between closely related species. For instance, *S. latifolia* is typically classified as a night pollinated species, while *S. dioica* is thought to be mainly pollinated during the day (Jürgens et al., 1996; Kephart et al., 2006). While in the former nocturnal pollinators - mainly moths - are indeed more efficient, with relatively higher seed-set during nocturnal pollination compared to diurnal pollination (Young, 2002; Scopece et al., 2018), pollination system remains more ambiguous for *S. dioica*, our study species (Jürgens et al., 1996; Waelti et al., 2008; Prieto-Benítez et al., 2015). Indeed, *S. dioica* is (i) visited by diurnal pollinators but also nocturnal moths (Jürgens et al., 1996), and (ii) sometimes presents fruit predation by larvae of *Hadena bicruris*, a moth involved in a nursery pollination interaction with *S. latifolia* (Dufaÿ and Anstett, 2003; Bopp and Gottsberger, 2004). These observations point towards a mixed-pollination system in *S. dioica*, although the exact effect of diurnal versus nocturnal pollinators on plant reproductive success remains to be evaluated. One feature that is particularly important for pollinator attraction, and could partly explain this preference for *Silene latifolia* by *Hadena bicruris*, is the quantity and nature of Volatile Organic Compounds (VOCs) emitted by flowers (Waelti et al., 2008; Page et al., 2014). Indeed, plant species with nocturnal pollination often emit more scent and rely more on floral scents for pollinator attraction than species pollinated during the day (Raguso et al., 2003; Dötterl et al., 2006).

Investigating the exact effects of floral scent on pollinator attraction is challenging, since floral scents are usually a blend of many different VOCs, and both identity and relative proportions can constitute an attractive signal for specific pollinators (Delle-Vedove et al., 2017). In this context, phenotypic manipulation is a useful tool to investigate the effects of isolated VOCs on pollinator attraction (Campbell, 2009; Landolt et al., 2013). For instance, the role of scent in pollinator attraction can be studied by artificially increasing the emission of one molecule that is known to be produced by the study plant and has documented effects on pollinator attraction. One of these VOCs, phenylacetylaldehyd (PAA, Benzenoïd) is known to be relatively widespread among angiosperms (Schiestl, 2010) and has been described to be of particular importance in moth attraction (Cantelo and Jacobson, 1979; Heath et al., 1992; Tóth et al., 2010). Several lines of evidence suggest that PAA can also be implicated in diurnal pollinator attraction: (i) butterfly species show a strong antennal responses to increased quantities of PAA (Andersson and Dobson, 2003), (ii) bumblebees have been shown to be able to develop a preference for this VOC when associated with reward (Knauer and Schiestl, 2015) and (iii) an experimental evolution study demonstrated that *Brassica rapa* populations showed an increase in PAA emission across generations when exposed to bumblebees (Gervasi and Schiestl, 2017). Although low compared to some other *Silene* species, in particular those described as being night-pollinated (Jürgens, 2004; Page et al., 2014), PAA emission can be found in relatively high amounts in floral scent of *S. dioica* (Waelti et al., 2008). Moreover, *Silene dioica* released similar amounts of VOCs (including PAA) during day and night (Waelti et al., 2008). This raises the question of how the emission of an attractive VOC impacts diurnal versus nocturnal pollinator attraction and plant reproductive success. Finally, PAA emission could interact with selection on the other attractive floral traits, if PAA enhances diurnal or nocturnal pollinator attraction. Indeed, this could weaken selection on other traits because scent emission would be a more important feature to pollinators (thus effectively removing the selective advantage of other attractive floral traits). On the contrary, PAA emission could strengthen selection on other traits by enhancing visits by specific pollinators, which

also use floral traits as visual cues when visiting the plants.

In this study, we explore the effect of diurnal versus nocturnal pollination on male and female reproductive success in dioecious *S. dioica*, as well as the effect of an artificial increase in PAA emission on selection on floral traits, in a fully-crossed design. We ask the following questions: (i) are individuals more limited in their reproductive success at night because of limited pollinator visits and/or predation by *Hadena bicruris*? (ii) Does an increase in PAA emission impact reproductive success (i.e. through better pollination and/or more predation), and does this effect vary between diurnal versus nocturnal pollination? (iii) Are the same attractive traits under selection when plants are exposed to diurnal versus nocturnal pollination? (iv) Does an increase in PAA emission affect selection gradients on floral traits? (v) How is pollen dispersal distance affected by diurnal versus nocturnal foraging behavior?

Material and Methods

Study system and plant material

Silene dioica (L.) Clairv. is a dioecious short-lived perennial species of the Caryophyllaceae family. It is widely distributed throughout most of northern and central Europe (Baker, 1947; Jalas and Suhominen, 1986). Sexual dimorphism on floral traits is common in this species, with males associated with larger flower sizes and flower numbers, as well as longer flowering durations, but females offering more nectar per flower (Kay et al., 1984; Hemborg, 1998; Barbot et al., in prep. A; Moquet et al., 2020). It has a generalist pollination system and is thought to be mainly pollinated during the day (Jürgens et al., 1996; Kephart et al., 2006), with *Bombus species* and Syrphidae described as main pollinators (Baker, 1947; Westerbergh and Saura, 1994; Jürgens et al., 1996), but Noctuidae species have also been shown to act as pollinators (Jürgens et al., 1996). Flowers of *Silene dioica* emit scents dominated by benzenoids (including PAA) and monoterpenoids, both during day and night, but to date nothing is known about the possible occurrence and magnitude of sexual dimorphism for scent emission and composition of the floral bouquet (Waelti et al., 2008).

Experimental population and common garden

Experimental plants were derived from seeds harvested in three forests located in northern France during 2015, 2016, 2017 and 2018. Seeds were collected at different study sites to reach a sufficient sample size without including full-sibs. The experimental population was set up in a common garden on the campus of Lille University in France (50°36'27.9"N 3°08'36.3"E), without wild populations of *Silene dioica* in close proximity. All individuals were in separate 0.7-L pots filled with a standard soil mixture, and were repoted each year.

Experimental treatments

We used a fully-crossed design to investigate the effect (i) of diurnal (D) versus nocturnal (N) pollination and (ii) of unmanipulated (C) versus increased (T) phenylacetylaldehyd (PAA) emission on reproductive success (Table 1). Individuals were kept in an insect-proof greenhouse until the beginning of the experiment. All plants were randomly assigned to one of the four groups before the experiment, which started at the beginning of July and lasted one week. The surface area of the experimental plot was of 31.35 m^2 (5.5 $\times$ 5.7 m) and density was 3.75 individuals.m^{-2}. In the experimental garden, for each pollination exposure treatment, individuals were spatially arranged in order to alternate (i) females and males and (ii) C and T treatments. HP females were placed five meters away from the

Table 1: Number of individuals and mean flower number per group.

PAA manipulation \ Pollinator exposure	Diurnal group (D)	Nocturnal group (N)
Control group, unmanipulated (C)	30 females: 11.57 ± 10.04 30 males : 25.30 ± 16.86	30 females: 12.50 ± 11.70 30 males: 26.50 ± 15.79
Treated group, increased PAA emission (T)	30 females: 10.96 ± 9.09 30 males: 23.47 ± 15.34	30 females: 10.03 ± 7.89 30 males: 26.50 ± 22.73

Notes: number of individuals per (i) pollinator exposure and (ii) PAA manipulation treatment, and mean ± standard-deviation in the mean number of flowers per treatment at the beginning of the experiment.

experimental plot.

Pollinator exposure - Each morning and evening, plants were moved between a pollinator-proof greenhouse and the experimental plot where they could be visited by the local pollinator fauna: (i) plants in the diurnal pollination group (D) were placed outside on average from 6:30 AM to 9:30 PM and (ii) plants in the nocturnal pollination group (N) were placed outside on average from 9:30 PM to 6:30 AM Exposure timing reflected shifts in pollinator communities in the experimental garden (pers. obs.).

PAA manipulation - Preliminary experiments were conducted to design a protocol allowing PAA emission in the T group to be doubled compared to natural emission in *S. dioica* (110 ng.h^{-1} per flower, with 20 flowers on average per plant, thus 2200 ng.h^{-1} per plant, Waelti et al., 2008). In all plant pots (i.e. both C and T plants), we planted a wood stick supporting a glass tube containing 4mL of paraffin oil. In plants from the T group, a 95% PAA solution was added (1:400 dilution in the paraffine). Tubes were then sealed and a 1μL micro-capillary tube was inserted in each glass tube in order to allow slow diffusion. Tubes were finally insulated with aluminum foil in order to minimize the differences in diffusion between day and night due to differences in temperature between treatments (Figure S1).

Estimating pollen limitation

To estimate pollen limitation in the experimental plot, a fifth and last group of 16 females were artificially pollinated (HP). We hand-pollinated all flowers of these females every other day with pollen from a pool of males from the same collection and kept in a greenhouse. For a given female and a given supplementation day, two pollen donors were randomly chosen in the pool and used to manually pollinate on average five open flowers, by brushing anthers of each donor on the stigmas. Pollen limitation was then quantified by comparing seed-set and fruit-set between DC, DT, NC, NT and HP females.

Measuring floral traits

We measured a set of floral traits on all individuals in the experimental population. Corolla size and calyx height were measured on two randomly chosen flowers per individual using a digital calliper precise to 0.01 mm. This was done two times: the first and last day of the experiment. Flower number was assessed on the same days. Measures for the 3 traits were then averaged prior to the analysis.

The number of gametes per flower was assessed for both sexes. For females, a total of 610 fruits (65% of the 933 fruits produced during the experiment) were dissected to estimate ovules production by imaging fruit content using a high resolution scanner (Epson Perfection V700 Photo,Seiko Epson, Suwa, Japan). For each fruit, the number of seeds and the number of unfertilized ovules was assessed

using the *EBImage* package in R (Pau et al., 2010), and summed, producing an estimate of the total number of ovules per fruit and thus of female fertility. Unfertilized ovules and seeds were distinguished on the basis of size (0.062 ± 0.031 mm^2 for unfertilized ovules versus 0.86 ± 0.12 mm^2 for seeds). The number of dissected fruits per female reflected its fruit production relatively to the overall fruit production at the population level.

For each male, total pollen production per flower was estimated. To do so, one nearly opened flower bud was collected just before the experiment and dissected. Pollen quantity was assessed on two anthers using a particle counter (CASY® Model TT,Roche Innovatis AG, Bielefeld, Germany) and following the protocol described in Dufaÿ et al. (2008). This pollen quantity was then multiplied by five to get an estimate of pollen production per flower, since Silene flowers have ten anthers.

Pollinator observations

Pollinator observations were conducted for each individual of the D group (i.e. diurnal pollination exposure treatment), using three 20 minutes sessions in the afternoon spread over the course of the experiment. Each pollinator visiting the experimental plot was visually identified (at the level of species, genus or family), and its sequence of flower visitation across plants was reported. Two different variables were characterized: (i) the number of independent pollinators visiting a given plant and (ii) the total number of flowers visited per plant. We also qualitatively characterized nocturnal pollinators diversity. Observation were conducted for one hour the third day of the experiment, at 11 PM, and involved (i) hanging a white sheet in the experimental garden and shining a light on it to attract and capture nocturnal pollinators and (ii) direct observations on the plants using a flash-light.

Estimation of predation

During fructification, plants were surveyed twice a day in order to assess the prevalence of fruits predated by *Hadena bicruris*. Each time a caterpillar was recorded on a (primary) predated fruit, presumably shortly after emergence, we immediately removed it in order to avoid other (secondary) fruits predation events either on the same or a neighboring plant. In those primary predated fruits, all seeds are eaten (Jolivet and Bernasconi, 2006). We noted the number of (primary) predated fruits per female, which thus corresponded to the number of eggs laid by Hadena bicruris because females avoid already pollinized flowers for oviposition (Burkhardt et al., 2012; Castillo et al., 2013).

Female reproductive success

Fruits were collected at maturity, typically three to five weeks after flower opening. Germination rate was estimated on a sub-sample of produced seeds (60 seeds per female) that were sown in petri dishes filled with 40mL of 10g.L^{-}1 agar in sterile water (photoperiod 14:10 and temperature 21-15°C). For each female, we estimated reproductive success as the number of viable seeds produced during the experiment, by multiplying mean seed number per fruit, total number of non-predated fruits and germination rate. One female had a stem broken during the experiment and was thus excluded from analyses as its reproductive success could not be assessed.

Male reproductive success

Male reproductive success was assessed by genotyping a subsample of seedlings (diurnal: 886 seedlings; nocturnal: 859 seedlings) and performing a paternity analysis. The number of genotyped seedlings per female was determined to reflect each mother's contribution to the total seed pool, and seedlings were also sampled randomly across the different fruits. Total genomic DNA from adults (120 females and

120 males) and seedlings was extracted and PCR assays were used to amplify five nuclear microsatellites following Barbot et al. (in prep. A). Paternity analysis was then performed using a spatially explicit model derived from the mixed effect mating model (MEMM) developed by Oddou-Muratorio et al. (2018), described in Barbot et al. (in prep. B). For each male, this model computes Bayesian estimates of (i) mean pollen dispersal distance and (ii) reproductive success, defined as the sum, across all mothers, of the product of each putative mother reproductive success and the paternity share. Male reproductive success is thus an estimate of the number of seeds that a male sired across all seeds that were produced over the course of the experiment.

Statistical analysis

Pollen limitation and fruit predation – The occurrence of pollen limitation was tested on two components of female reproductive success by assessing differences between HP females and females from the four other groups (DC, DT, NC and NT) in (i) fruit-set (i.e. fruit number divided by the number of flowers produced during the experiment) and (ii) seed-set (i.e. seed number divided by ovule number). Concerning fruit-set, we conducted analyses using (i) primary fruit-set (including predated and non-predated fruits) and (ii) effective fruit-set (i.e. non-predated fruits only). The former index assesses if there was enough pollen to maximize fruit initiation, while the latter index takes into account both benefit and potential cost of attracting pollinators. By definition, seed-set was estimated on non-predated fruits only. Differences among treatments in the two estimates of fruit-set were assessed using generalized linear models with a binomial error distribution, with a fixed effect of group (HP, DC, DT, NC and NT females), using the lme4 package (Bates et al., 2015). Differences in seed-set were assessed using a generalized linear mixed model with a binomial error distribution, with a fixed effect of group and a random effect of individual as several fruits were dissected per female. Post-hoc Tukey's tests were performed to compare groups.

Diurnal pollinator observations – Generalized linear models with a Poisson error distribution and type II ANOVA were used to investigate the effect of sex and PAA treatment on both descriptors of pollinator visit (i.e. number of independent pollinators visiting a given plant and total number of visited flowers per plant). Observation data were only available for plants exposed to the diurnal treatment (D).

Exclusion & PAA treatments effect on reproductive success - As reproductive success was estimated using sex-specific estimation methods, we conducted the analyses described hereafter per sex.

Absolute reproductive success – We analyzed absolute reproductive success by using generalized linear models and type III ANOVA, with an effect of (i) exclusion treatment, (ii) PAA treatment and (iii) their interaction. We also compared variances in absolute reproductive success distribution between treatments within sex, using Levene's tests.

Selection gradients on floral traits – We performed analyses using relative reproductive success and standardized trait values, following standard recommendations (Lande and Arnold, 1983; De Lisle and Svensson, 2017). We computed relative reproductive success per exclusion treatment, because individual reproductive success is expected to be determined in part by pollinators abundance and diversity, which were different between night and day. Traits were also standardized within sex to provide estimates of selection gradients comparable between sexes. We accounted for uncertainties in the estimation of male reproductive success by modeling prior weights of a posteriori distributions of the MEMM model. We first estimated selection gradients separately for each of the four PAA treat-

Table 2: Seed-set, primary fruit-set (including predated fruits) and effective fruit-set (only non-predated fruits) for each experimental female group.

Female group	Seed-set (± SE)	Realized fruit-set (± SE)	Fruit-set with seeds (± SE)
HP (hand-pollinated)	0.49 (± 0.0028)	0.96 (± 0.0042)	0.93 (± 0.0052)
DC (diurnal with control PAA)	0.57 (± 0.0015)	0.92 (± 0.0049)	0.91 (± 0.0049)
DT (diurnal with manipulated PAA)	0.56 (± 0.0017)	0.91 (± 0.0052)	0.91 (± 0.0052)
NC (nocturnal with control PAA)	0.57 (± 0.0015)	0.94 (± 0.0036)	0.88 (± 0.0069)
NT (nocturnal with manipulated PAA)	0.55 (± 0.0017)	0.91 (± 0.0051)	0.77 (± 0.0011)

Notes: the value indicated in bold is significantly lower than what was observed in the HP group (P=.012).

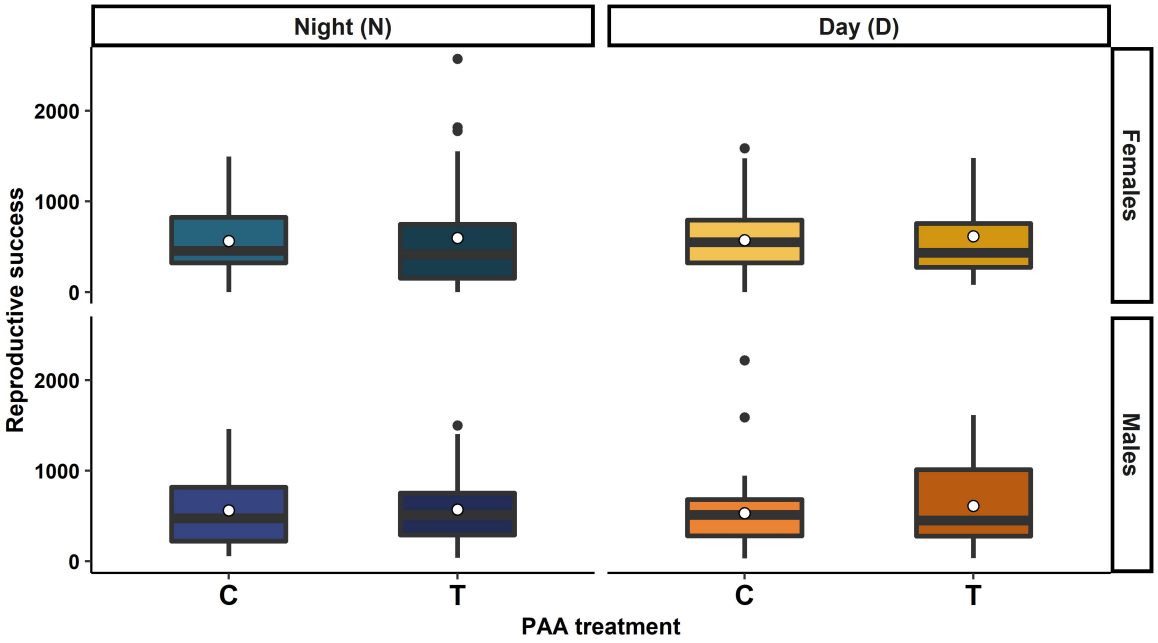


Figure 1: Absolute reproductive success per sex, per exclusion treatment (day versus night) and per PAA treatment (control or increased). Neither PAA treatment nor exclusion treatment significantly affected reproductive success.

ment × exclusion treatment combination, using multiple linear regression models with all measured trait as independent variables (i.e. flower number, number of gametes per flower, corolla width and calyx height). To test whether selection gradients differed between treatments, we then analyzed data separately for each (i) PAA treatment or (ii) exclusion treatment, using two-way ANCOVAs. In these models, each measured trait was fitted as an independent variable interacting respectively with (i) exclusion treatment (model A) or (ii) PAA treatment (model B). For model A, a significant trait × exclusion treatment term would indicate that selection on this trait differs between day and night. For model B, a significant trait × PAA treatment term would mean that selection on this trait differs between control and increased PAA treatment.

Pollen dispersal distance – We assessed whether mean pollen dispersal distances were affected by (i) the exclusion treatment, (ii) the PAA treatment and (iii) their interaction, using two-way ANOVA. Weights were included in the model to assess uncertainty of a posteriori individual mean pollen dispersal distances obtained with the Bayesian MEMM model.

Results

No pollen limitation but an increase in nocturnal fruit predation with PAA

We found no evidence of pollen limitation in our experimental groups (Table 2), as revealed by a non-significant effect of treatments in models predicting seed-set ($\chi^2_{4,1,609} = 2.07, P = .73$) and primary fruit-set ($\chi^2_{4,134} = 2.09, P = .72$). However, effective fruit-set (i.e. only non-predated fruits) was lower for NT females (i.e. Nocturnal females with manipulated PAA), as revealed by the results of the Tukey's test ($\chi^2_{4,134} = 19.23, P = .012$; Table 2). Overall, predated fruits represented 5.1% of fruits produced during the experiment, and this percentage increased to 10.6% for females only exposed to nocturnal pollinators (5.94% in control females and 15.6% in females with increased PAA emission).

PAA increased total number of pollinator visits on males during the day

In the experimental population, diurnal pollinators were mainly Bombus sp (*B. terrestris*, *B. pascuorum* and *B. hortorum*), as well as Syrphidae (*Scaeva sp.* and *Sphaerophoria sp.*). We also observed some occurrences of Halictidae (*Lasioglossum sp.*) and Sphyngidae (*Macroglossum stellatarum*). Nocturnal pollinators included Noctuidae (*Hadena bicruris* and *Autographa sp*) and Pyralidae. Diurnal pollinators were more attracted by males than females, as indicated by the effect of sex on both the number of independent pollinators visiting a given plant ($\chi^2_{1,119} = 71.91, P < .001$) and the total number of flowers visited per plant ($\chi^2_{1,119} = 259.01, P < .001$). PAA increase did not modify visitation patterns on females (independent visits: $\chi^2_{1,59} = 0.17, P = 0.68$; total visits: $\chi^2_{1,59} = 0.13, P = 0.71$), but increased the number of total visits on males (independent visits: $\chi^2_{1,59} = 0.13, P = 0.72$; total visits: $\chi^2_{1,59} = 6.86, P < .01$, with 4.27 ± 0.17 and 6.10 ± 0.19 pollinator visits on DC and DT male plants, respectively).

No effect of exclusion and PAA treatments on reproductive success

Overall, PAA emission exacerbation did not affect either female or male reproductive success (females: $F_{1,1,1,115} = 0.083, P = 0.77$; males: $F_{1,1,1,116} = 0.081, P = 0.93$; Figure 1). There was no difference in mean reproductive success between diurnal and nocturnal pollination in either sex (females: $F_{1,1,1,115} = 0.0060, P = 0.94$; males: $F_{1,1,1,116} = 0.075, P = 0.78$) and no significant effect of the interaction between PAA treatment and exclusion treatment (females: $F_{1,1,1,11} = 0.0035, P = 0.95$; males: $F_{1,1,1,116} = 0.21, P = 0.65$). Finally, variances in reproductive success were not different between groups as revealed by Levene's tests (Table S1).

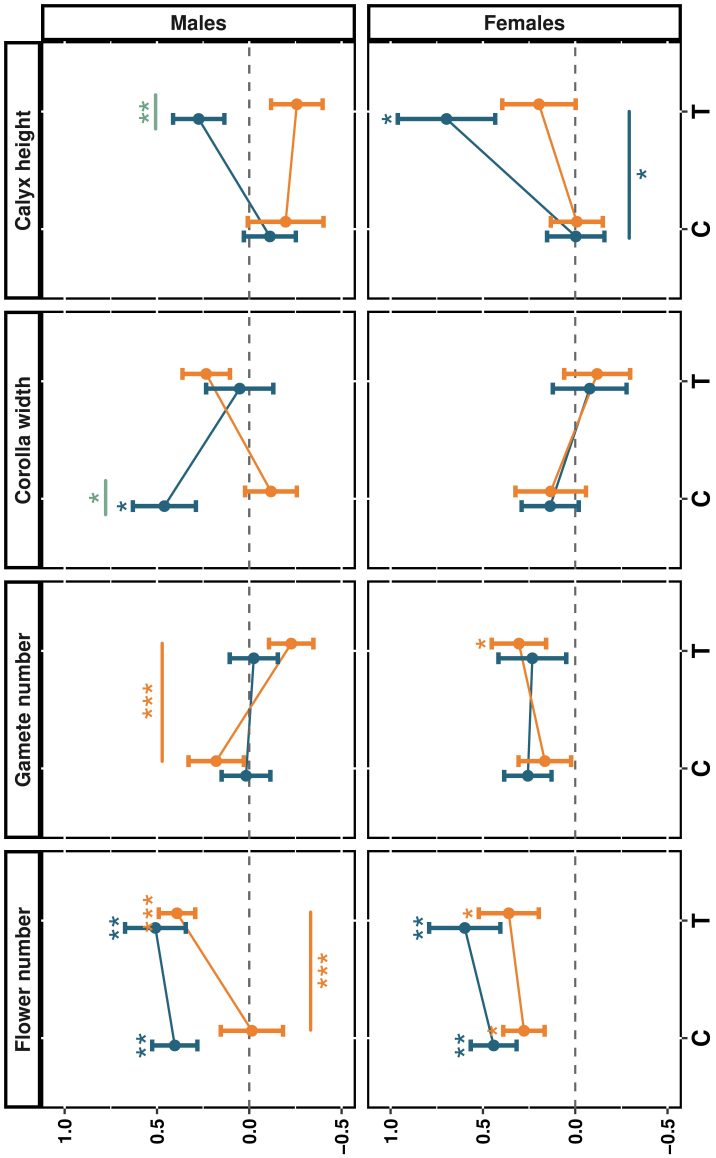


Figure 2: Selection gradients estimation on floral traits in each sex, and for (i) exclusion treatment and (ii) PAA treatment. Yellow dots and error bars represent selection gradient estimates for the Diurnal pollination group (D), whereas blue dots and error bars represent selection gradient estimates for the Nocturnal pollination group (N). In each panel, selection gradient estimates for the PAA control group (C) are represented on the left, whereas selection gradient estimates for the PAA manipulated group (T) are represented on the right. *P*-values are represented with $\star < 0.05$, $\star\star < 0.01$ and $\star\star\star < 0.001$. Significant values on the top of error bars refer to selection gradients that are significantly different from zero in that particular group (i.e. PAA treatment x exclusion treatment combination). Solid horizontal lines represent significant difference in selection strength between treatments, with (i) yellow indicating a difference between C and T (PAA treatment) for the Diurnal pollination group (D), (ii) blue line indicating a difference between C and T (PAA treatment) for the Nocturnal pollination group (N), and (iii) green indicating a difference between D and N (exclusion treatment) within the PAA control group (C) or within the PAA manipulated group (T).

Selection gradients differ between treatments

All results on selection patterns are synthetized in Figure 2, but selection gradient estimates per group and test statistics for comparisons between treatments are reported in supplementary (Table S2; Table S3; Table S4; Table S5).

Males - Flower number was under positive selection in all categories of males except those exposed to diurnal pollinators and with no increased PAA emission (Figure 2). Selection on gamete number in males exposed to diurnal pollinators depended on the PAA treatment, with lower (and slightly negative) selection on pollen production in males with increased in PAA emission compared to controls. Nonetheless, selection gradients on gamete number were never significantly different from zero. There was positive selection on corolla width in males exposed to nocturnal pollinators, and belonging to the control PAA group. Finally, selection on calyx height was found in males exposed to nocturnal pollinators and with increased PAA emission.

Females - We found positive selection on flower number both during day and night, independently of the PAA treatment in females (Figure 2). Gamete number tended to be selected for in all female groups, but was found significant only in PAA females exposed during the day. Corolla width was not associated with increased female reproductive success in any of the four groups. Concerning calyx height, we found the same pattern as in males, with positive selection on this trait only in females pollinated during night and with increased PAA emission.

Nocturnal pollinators disperse pollen further

Mean pollen dispersal distance was higher during the night (DM: 1.62m $\pm$ 0.0041, NM: 1.92m $\pm$ 0.0096; $F_{1,1,1,116} = 28.72, P < .001$) but was not affected by PAA treatment ($F_{1,1,1,116} = 0.87, P = 0.35$; Figure 3). There was no effect of interaction between pollinator exposure and PAA treatments on pollination distances ($F_{1,1,1,116} = 0.16, P = 0.69$).

Discussion

Silene dioica has mainly been described as a diurnal species, although it exhibits some floral traits that could indicate adaptation to nocturnal pollination (i.e. flowers that are opened during both day and night and that emit a continuous amount of floral scent; Prieto-Benítez et al., 2015; Jürgens et al., 1996).

No occurrence of pollen limitation during day and night

Here, we report that there is no pollen limitation when plants are only pollinated by nocturnal insects, suggesting that *S. dioica* has evolved traits that allows efficient pollination through both diurnal and nocturnal pollinator communities. Nonetheless, predation by *Hadena bicruris* might weaken the selective advantage of being pollinated by both communities. Here, we reported 10.6% of predated fruits in females exposed to nocturnal pollinators, and this value was even higher in females with increased PAA emission (15.6%). This higher rate of predation was not strong enough to significantly reduce the reproductive success of these plants in our experiment, although *Hadena*'s impact was certainly minimized by preventing secondary predation events. Whether such damages lead to counter selection on floral traits involved in attraction of nocturnal pollinators remains unclear, because the cost of attracting Hadena pollinators may not be stable across time and space. In an experiment conducted the previous year in the same experimental garden and on the same plant collection, we reported only 1.3% of predated fruits across the whole flowering season (unpublished data). Overall,

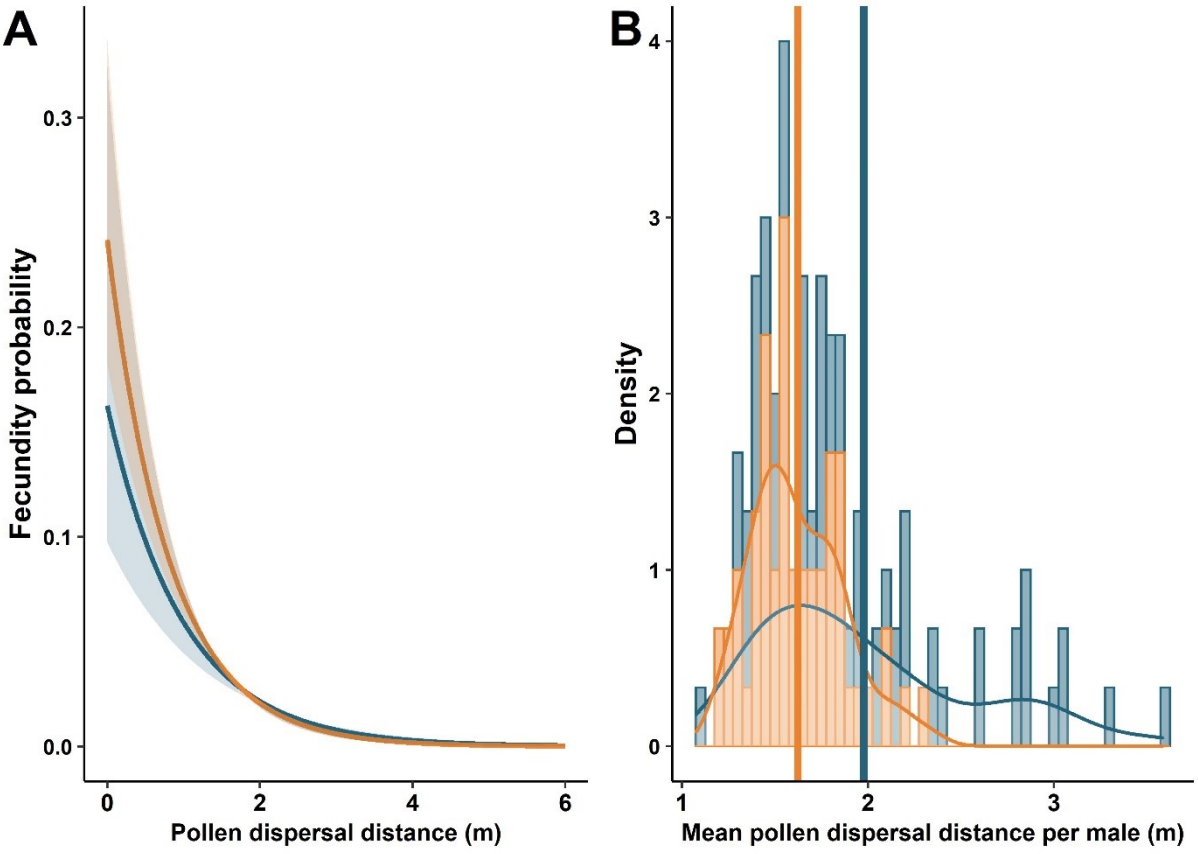


Figure 3: Pollen dispersal kernel (A) and distribution in mean pollen dispersal distance per male (B), for day-pollinated males in orange and for night-pollinated males in blue. The method that was used to obtain the pollen dispersal kernel is described in Text S1. In graph (B), vertical solid lines represent mean fecundity distance for each exclusion treatment. The observed gap in low values for mean pollen dispersal distance per male (< 1m) is due to the spatial arrangement of plants in our experimental population.

the negative impact of *Hadena sp* on female fitness has been found to strongly vary among dates and locations (Pettersson, 1991) and this may be the case in our study model.

Sex-specific selection on floral traits according to pollinators and PAA emission

For some of the studied floral traits, selection strength depended on the PAA treatment (control or increased emission) and on which pollinator community was allowed to access the flowers (diurnal versus nocturnal). In our experiment, two lines of evidence suggest that increased PAA emission impacted pollinator behavior: (i) during the day, insects seemed to perform more visits on male plants with increased PAA and (ii) although no direct pollinator observations were performed during night, the fact that PAA females showed higher predation rates strongly suggests that this VOC could play a role in *Hadena* attraction. These results are in line with the documented role of PAA in pollinator attraction (Cantelo and Jacobson, 1979; Heath et al., 1992; Tóth et al., 2010; Knauer and Schiestl, 2015) and may partly explain why selection gradients were sometimes different when comparing groups with and without increased PAA emission.

In females, the fact that none of the experimental groups showed any pollen limitation suggested an absence of pollinator-mediated selection on floral traits under our experimental conditions. Consistently, most selection gradients were found to be similar among pollination treatments. Flower number was positively selected in all treatments, but based on two previous studies in *S. dioica*, fertility selection rather than pollinator-mediated selection seems to be responsible for this general trend towards positive selection on flower number (Barbot et al., in prep. A,B). Interestingly, calyx height was significantly positively selected in females exposed during the night with increased PAA emission, but not in other treatment combinations. The mechanism responsible for this selection pattern in females that were not pollen limited remains an open question.

In males, control plants exposed during the day showed no pattern of positive selection on flower number, as it has been found in males exposed day and night in a previous experiment (Barbot et al., in prep. B). However, when exposed solely to nocturnal pollinators and/or when being associated with an increased PAA emission, male plants showed positive selection on flower number. Although selection on flower number is expected to be partly explained by fertility selection (as floral display increases the overall number of pollen grains produced by the plant), the fact that the strength of selection depended on the category of visitors and/or on a signal that is potentially attractive for pollinators suggests that pollinators could be responsible for the observed differences in selection gradients. One possibility would be that nocturnal insects show a preference for large floral displays and export more pollen when visiting these plants. Further studies will be needed to identify the nature of the signal that is responsible for this potential preference for large displays: larger males are likely to emit higher overall COV quantities, but their display could also constitute a visual signal (in nocturnal pollinators, compound eyes are highly adapted to obtain enough light to generate optical stimuli, Macgregor and Scott-Brown, 2020).

Regarding the effect of PAA emission on the strength of selection flower number during the day time, there are at least two possible explanations. First, diurnal pollinator observations suggested that the PAA treatment resulted in a higher number of flowers visited per plant and per pollinator, which might result in a higher number of pollen grains on pollinators bodies and a better pollen export, at least in individuals with large displays. Second, VOC emission can be under strong pollinator-mediated selection in species with diurnal pollination (Parachnowitsch et al., 2012), and because our

PAA treatment presumably removed most of the variation for that trait, it could have artificially created selection on another variable trait, flower number.

Along with positive selection on flower number in males exposed to nocturnal pollinators, we found positive selection on corolla width for males pollinated by nocturnal species only for control plants. Selection on flower size was also found in a previous study on plants exposed during day and night (Barbot et al., in prep. B). This suggests that selection patterns may be mainly driven by nocturnal pollinators. This positive selection on corolla width for nocturnal pollinators could be explained by an increased visual signal (i.e. pollinator attraction) and/or a better fit between nocturnal species and larger flower. Nocturnal species observed during our experiment were exclusively moths' species, which have larger bodies than some diurnal pollinators as Syrphidae or Halictidae. Thus, larger flowers could increase the contact surface between anthers and the pollinator body, enhancing pollen removal.

We found stronger positive selection on calyx height in PAA males exposed to nocturnal pollinators compared to diurnal pollinators. This positive selection on calyx height in PAA males could be explained by the long proboscis typical to moths that we observed during the experiment (*Autographa gamma* 15.8 mm on average, *Hadena bicruris* 22.9 mm; Jürgens et al., 1996, compared to an average calyx length of 19.2 mm in males in our experiment). We did not directly observe the behavior of nocturnal pollinators in our experiment, but the fact (i) that PAA female showed higher *Hadena* and (ii) the fact that *H. bicruris* does not discriminate between sexes when visiting the sister species, *Silene latifolia* (Labouche and Bernasconi, 2009) might suggest that males of the PAA treatment were more visited than control males during the night. Males with short calyxes may thus be disadvantaged, since this morphology precludes a full insertion of the proboscis and thus reduces contact between the pollinator and the anthers (Nilsson, 1988). This could in fine decrease male reproductive success (Sletvold and Ågren, 2011). It is noteworthy that a previous experiment that investigated selection gradients on calyx height in males and females in *S. dioica* did not report any specific selection pattern (Barbot et al., in prep. A). Presumably, this discrepancy could be explained by the fact that diurnal pollinators should not induce such selection on calyx height (diurnal pollinators include pollen-feeding pollinators, such as Halictidae or Syrphidae and *Bombus terrestris* has a mean length proboscis of 9.0 mm Jürgens et al., 1996). This divergent selection pressures may have precluded detection of selection on calyx height when investigating overall selection mediated by both diurnal and nocturnal pollinators.

Nocturnal pollinators disperse pollen further

Finally, estimated pollen dispersal distances were extremely restricted, a feature that is common among herbs (e.g. De Cauwer et al., 2012; Tonnabel et al., 2019), particularly in insect-pollinated species (Hardy et al., 2004; Llaurens et al., 2008; Van Rossum et al., 2011). We observed differences in mean dispersal pollen distances mediated by diurnal versus nocturnal pollinators, with nocturnal pollinators dispersing pollen on average 18.5% further, an effect that was also described in *Silene alba* (Barthelmess et al., 2006). This pattern could have consequences in terms of reproductive success. Indeed, natural populations of *S. dioica* have been shown to display strong spatial genetic structure even at very fine scale (Ingvarsson and Giles, 1999), presumably because both pollen and seed dispersal distances occur over very restricted distances. Given what we now know average pollination distances in the species, biparental inbreeding, and thus potentially inbreeding depression, might be a common feature of reproduction in wild populations, especially in populations that are more exposed to diurnal pollinators. Future studies should investigate whether structuration of genetic diversity may increase the potential benefits in terms of reproductive success of nocturnal pollination compared to pollination

events that occur during the day.

Conclusion

To conclude, this study documented more and stronger responses of selection gradients on floral traits, to changes in pollinator communities and in the level of emission a VOC implicated in pollinator attraction, in males than in females. This could be interpreted as indirect evidence that males are more dependent of pollinator attraction than females in their reproductive success. Nonetheless, we have to be careful with our conclusions. The pollinator community reported here is likely to not be representative of those present *in natura*, which can also highly vary among natural populations according to the ecological context. Moreover, we did not assess variation in VOCs among individuals and between sexes. Sexual dimorphism for VOCs could also explain why we did not observe the same selection patterns on floral traits in each sex. Integrating VOC emission into an exclusion experiment to assess selection on floral traits in different pollination context would allow a better understanding of the relative importance of visual versus olfactive signals in pollinator attraction in each sex.

Acknowledgments

We would like to thank E. Klein for letting us access the MEMM model. For laboratory assistance, we thank C. Gode and L. Debacker. We thank J. Tonnabel and M. Dubart for precious advices about MEMM model implementation.

Funding

This work is a contribution to the CPER research project CLIMIBIO. The authors thank the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Hauts de France Region and the European Funds for Regional Economical Development for their financial support to this project.

References

Andersson, S. and Dobson, H. E. M. (2003). Antennal responses to floral scents. *Journal of Chemical Ecology*, 29:2319–2330.

Baker, H. G. (1947). *Melandrium dioicum* (L. emend) Coss. & Germ. *Journal of Ecology*, 35:283–292.

Balkenius, A., Rosén, W., and Kelber, A. (2006). The relative importance of olfaction and vision in a diurnal and a nocturnal hawkmoth. *Journal of Comparative Physiology A*, 192:431–437.

Barbot, E., Dufaÿ, M., and De Cauwer, I. (in prep. A). Natural and sexual selection in an insect-pollinated plant.

Barbot, E., Dufaÿ, M., Tonnabel, J., Godé, C., and De Cauwer, I. (in prep. B). On the function of flower number: disentangling fertility from pollinator-mediated sexual and natural selection.

Barthelmess, E. L., Richards, C. M., and McCauley, D. E. (2006). Relative effects of nocturnal vs diurnal pollinators and distance on gene flow in small *Silene alba* populations. *New Phytologist*, 169:689–698.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., and Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using *lme4*. *Journal of Statistical Software*, 67:1–48.

Bopp, S. and Gottsberger, G. (2004). Importance of *Silene latifolia* ssp. *alba* and *S. dioica* (Caryophyllaceae) as host plants of the parasitic pollinator *Hadena bicruris* (Lepidoptera, Noctuidae). *Oikos*, 105:221–228.

Burkhardt, A., Ridenhour, B. J., Delph, L. F., and Bernasconi, G. (2012). The contribution of a pollinating seed predator to selection on *Silene latifolia* females. *Journal of Evolutionary Biology*, 25:461–472.

Campbell, D. R. (2009). Using phenotypic manipulations to study multivariate selection of floral trait associations. *Annals of Botany*, 103:1557–1566.

Cantelo, W. W. and Jacobson, M. (1979). Phenylacetaldehyde attracts moths to bladder flower and to blacklight traps. *Environmental Entomology*, 8:444–447.

Caruso, C. M., Eisen, K. E., Martin, R. A., and Sletvold, N. (2019). A meta-analysis of the agents of selection on floral traits. *Evolution*, 73:4–14.

Castillo, D. M., Kula, A. A. R., Fenster, K. A. D., Fenster, C. B., and Dudash, M. R. (2013). Specialist pollinating seed predator exhibits oviposition strategy consistent with optimal oviposition theory. *Ecological Entomology*, 38:164–172.

Darwin, C. (1862). *On the various contrivances by which british and foreign orchids are fertilized by insects*, volume 10. London.

De Cauwer, I., Arnaud, J.-F., Klein, E. K., and Düfay, M. (2012). Disentangling the causes of heterogeneity in male fecundity in gynodioecious *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *New Phytologist*, 195:676–687.

De Lisle, S. P. and Svensson, E. I. (2017). On the standardization of fitness and traits in comparative studies of phenotypic selection. *Evolution*, 71:2313–2326.

Delle-Vedove, R., Schatz, B., and Düfay, M. (2017). Understanding intraspecific variation of floral scent in light of evolutionary ecology. *Annals of Botany*, 120:1–20.

Dufaÿ, M. and Anstett, M.-C. (2003). Conflicts between plants and pollinators that reproduce within inflorescences: evolutionary variations on a theme. *Oikos*, 100:3–14.

Dufaÿ, M., Vaudey, V., De Cauwer, I., Touzet, P., Cuguen, J., and Arnaud, J.-F. (2008). Variation in pollen production and pollen viability in natural populations of gynodioecious *Beta vulgaris* ssp. *maritima* : evidence for a cost of restoration of male function? *Journal of Evolutionary Biology*, 21:202–212.

Dötterl, S., Jurgens, A., Seifert, K., Laube, T., Weissbecker, B., and Schutz, S. (2006). Nursery pollination by a moth in *Silene latifolia*: the role of odours in eliciting antennal and behavioural responses. *New Phytologist*, 169:707–718.

Fenster, C. B., Armbruster, W. S., Wilson, P., Dudash, M. R., and Thomson, J. D. (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35:375–403.

Gervasi, D. D. L. and Schiestl, F. P. (2017). Real-time divergent evolution in plants driven by pollinators. *Nature Communications*, 8:14691.

Giménez-Benavides, L., Dötterl, S., Jürgens, A., Escudero, A., and Iriondo, J. M. (2007). Generalist diurnal pollination provides greater fitness in a plant with nocturnal pollination syndrome: assessing the effects of a *Silene-Hadena* interaction. *Oikos*, 116:1461–1472.

Gong, Y.-B. and Huang, S.-Q. (2009). Floral symmetry: pollinator-mediated stabilizing selection on flower size in bilateral species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276:4013–4020.

Graham, S. W. and Barrett, S. C. H. (2004). Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphisms in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany*, 91:1007–1021.

Greuter, W. (1995). *Silene (Caryophyllaceae)* in Greece: a subgeneric and sectional classification. *Taxon*, 44:543–581.

Harder, L. D. and Johnson, S. D. (2009). Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytologist*, 183:530–545.

Hardy, O. J., González-Martínez, S. C., Fréville, H., Boquien, G., Mignot, A., Colas, B., and Olivieri, I. (2004). Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae) I. Pattern of pollen dispersal. *Journal of Evolutionary Biology*, 17:795–806.

Heath, R. R., Landolt, P. J., Dueben, B., and Lenczewski, B. (1992). Identification of floral compounds of night-blooming jessamine attractive to cabbage looper moths. *Environmental Entomology*, 21:854–859.

Hemborg, Å. M. (1998). Seasonal dynamics in reproduction of first-year females and males in *Silene dioica*. *International Journal of Plant Sciences*, 159:958–967.

Hoballah, M. E., Gübitz, T., Stuurman, J., Broger, L., Barone, M., Mandel, T., Dell'Olivo, A., Arnold, M., and Kuhlemeier, C. (2007). Single gene–mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. *The Plant Cell*, 19:779–790.

Ingvarsson, P. K. and Giles, B. E. (1999). Kin-structured colonization and small-scale genetic differentiation in *Silene dioica*. *Evolution*, 53:605–611.

Jalas, J. and Suhominen, J. (1986). *Atlas florae europaeae: distribution of vascular plants in Europe. 7. Caryophyllaceae (Silenoideae)*. Cambridge University Press, Cambridge.

Jolivet, C. and Bernasconi, G. (2006). Experimental analysis of constitutive and induced defence in a plant-seed-predator system. *Functional Ecology*, 20:966–972.

Jürgens, A. (2004). Flower scent composition in diurnal Silene species (Caryophyllaceae): phylogenetic constraints or adaption to flower visitors? *Biochemical Systematics and Ecology*, 32:841–859.

Jürgens, A., Witt, T., and Gottsberger, G. (1996). Reproduction and pollination in Central European populations of *Silene* and *Saponaria* species. *Botanica Acta*, 109:316–324.

Kay, Q. O. N., Lack, A. J., Bamber, F. C., and Davies, C. R. (1984). Differences between sexes in floral morphology, nectar production and insect visits in a dioecious species, *Silene dioica*. *New Phytologist*, 98:515–529.

Kephart, S., Reynolds, R. J., Rutter, M. T., Fenster, C. B., and Dudash, M. R. (2006). Pollination and seed predation by moths on *Silene* and allied Caryophyllaceae: evaluating a model system to study the evolution

of mutualisms. *New Phytologist*, 169:667–680.

Knauer, A. C. and Schiestl, F. P. (2015). Bees use honest floral signals as indicators of reward when visiting flowers. *Ecology Letters*, 18:135–143.

Koto, M. (2019). Anthophilous insect community and plant-pollinator interactions on Amami Islands in the Ryukyu Archipelago, Japan. *Contr. biol. Lab. Kyoto Univ.*, 29:157–152.

Labouche, A.-M. and Bernasconi, G. (2009). Male moths provide pollination benefits in the *Silene latifolia–Hadena bicruris* nursery pollination system. *Functional Ecology*, 24:534–544.

Lande, R. and Arnold, S. J. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 37:1210–1226.

Landolt, P. J., Tóth, M., Meagher, R. L., and Szarukán, I. (2013). Interaction of acetic acid and phenylacetaldehyde as attractants for trapping pest species of moths (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 69:245–249.

Llaurens, V., Castric, V., Austerlitz, F., and Vekemans, X. (2008). High paternal diversity in the self-incompatible herb *Arabidopsis halleri* despite clonal reproduction and spatially restricted pollen dispersal. *Molecular Ecology*, 17:1577–1588.

Macgregor, C. J. and Scott-Brown, A. S. (2020). Nocturnal pollination: an overlooked ecosystem service vulnerable to environmental change. *Emerging Topics in Life Sciences*, 4:19–32.

Moquet, L., Jacquemart, A.-L., De Cauwer, I., and Dufaÿ, M. (in prep.). Effects of sexual dimorphism on pollinator behaviour in a dioecious species.

Moquet, L., Lateur, L., Jacquemart, A.-L., De Cauwer, I., and Düfay, M. (2020). Temporal dynamics of sexual dimorphism in a dioecious species. *Annals of Botany*, 126:471–480.

Nilsson, L. A. (1988). The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature*, 334:147–149.

Oddou-Muratorio, S., Gauzere, J., Bontemps, A., Rey, J.-F., and Klein, E. K. (2018). Tree, sex and size: ecological determinants of male vs. female fecundity in three *Fagus sylvatica* stands. *Molecular Ecology*, 27:3131–3145.

Page, P., Favre, A., Schiestl, F. P., and Karrenberg, S. (2014). Do flower color and floral scent of silene species affect host preference of *Hadena bicruris*, a seed-eating pollinator, under field conditions? *PLoS ONE*, 9:e98755.

Parachnowitsch, A. L., Raguso, R. A., and Kessler, A. (2012). Phenotypic selection to increase floral scent emission, but not flower size or colour in bee-pollinated *Penstemon digitalis*. *New Phytologist*, 195:667–675.

Pau, G., Fuchs, F., Sklyar, O., Boutros, M., and Huber, W. (2010). *EBImage* - an R package for image processing with applications to cellular phenotypes. *Bioinformatics*, 26:979–981.

Peakall, R., Ebert, D., Poldy, J., Barrow, R. A., Francke, W., Bower, C. C., and Schiestl, F. P. (2010). Pollinator specificity, floral odour chemistry and the phylogeny of Australian sexually deceptive *Chiloglottis orchids*: implications for pollinator-driven speciation. *New Phytologist*, 188:437–450.

Pellmyr, O. (1992). Multiple occurrences of mutualism in the yucca moth lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2927_2929.

Pettersson, M. W. (1991). Flower herbivory and seed predation in *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae): effects of pollination and phenology. *Ecography*, 14:45–50.

Prieto-Benítez, S., Dötterl, S., and Giménez-Benavides, L. (2015). Diel variation in flower scent reveals poor consistency of diurnal and nocturnal pollination syndromes in Sileneae. *Journal of Chemical Ecology*, 41:1095–1104.

Raguso, R. A., Levin, R. A., Foose, S. E., Holmberg, M. W., and McDade, L. A. (2003). Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination "syndromes" in Nicotiana. *Phytochemistry*, 63:265–284.

Schemske, D. W. and Bradshaw, H. D. (1999). Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *PNAS*, 96:11910–11915.

Schiestl, F. P. (2010). The evolution of floral scent and insect chemical communication. *Ecology Letters*, 13:643–656.

Scopece, G., Campese, L., Duffy, K. J., and Cozzolino, S. (2018). The relative contribution of diurnal and nocturnal pollinators to plant female fitness in a specialized nursery pollination system. *AoB PLANTS*,

10:ply002.

Shykoff, J. A. and Bucheli, E. (1995). Pollinator visitation patterns, floral rewards and the probability of transmission of *Microbotryum violaceum*, a veneral disease of plants. *The Journal of Ecology*, 83:189–198.

Sletvold, N. and Ågren, J. (2011). Nonadditive effects of floral display and spur length on reproductive success in a deceptive orchid. *Ecology*, 92:2167–2174.

Sletvold, N., Trunschke, J., and Wimmergren, C. (2012). Separating selection by diurnal and nocturnal pollinators on floral display and spur length in *Gymnadenia conopsea*. 93:1880–1891.

Stone, J. D. and Olson, M. S. (2018). Pollination context alters female advantage in gynodioecious *Silene vulgaris*. *Journal of Evolutionary Biology*, 31:111–122.

Tonnabel, J., David, P., Klein, E. K., and Pannell, J. R. (2019). Sex-specific selection on plant architecture through "budget" and "direct" effects in experimental populations of the wind-pollinated herb, *Mercurialis annua*. *Evolution*, 73:897–912.

Tóth, M., Szarukán, I., Dorogi, B., Gulyás, A., Nagy, P., and Rozgonyi, Z. (2010). Male and female noctuid moths attracted to synthetic lures in europe. *Journal of Chemical Ecology*, 36:592–598.

Van Rossum, F., Stiers, I., Van Geert, A., Triest, L., and Hardy, O. J. (2011). Fluorescent dye particles as pollen analogues for measuring pollen dispersal in an insect-pollinated forest herb. *Oecologia*, 165:663–674.

Vanderplanck, M., Touzet, P., Van Rossum, F., Lahiani, E., De Cauwer, I., and Dufaÿ, M. (2020). Does pollination syndrome reflect pollinator efficiency in *Silene nutans?* *Acta Oecologica*, 105:103557.

Waelti, M. O., Muhlemann, J. K., Widmer, A., and Schiestl, F. P. (2008). Floral odour and reproductive isolation in two species of *Silene*. *Journal of Evolutionary Biology*, 21:111–121.

Westerbergh, A. and Saura, A. (1994). Gene flow and pollinator behaviour in *Silene dioica* populations. *Oikos*, 71:215–224.

Whittall, J. B. and Hodges, S. A. (2007). Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature*, 447:706–709.

Wu, Y., Zhong, T., Zhang, Z.-Q., and Li, Q.-J. (2018). Pollinator-mediated selection on floral traits varies in space and between morphs in *Primula secundiflora*. *AoB PLANTS*, 10:ply059.

Young, H. J. (2002). Diurnal and nocturnal pollination of *Silene alba* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany*, 89:433–440.

Zhang, M. (2017). Plant sex affects the structure of plant–pollinator networks in a subtropical forest. *Oecologia*, 185:269–279.

Supplementary material

Table S1: Results from pairwise Levene's tests for homogeneity of variance in reproductive success between groups (i.e. PAA treatment × exclusion treatment combination).

Sex	Comparison	F-value	P-value
Males	DMC-DMT	$F_{1,58} = 0.60$	$P = 0.44$
	NMC-NMT	$F_{1,58} = 0.54$	$P = 0.46$
Females	DFC-DFT	$F_{1,58} = 1.39$	$P = 0.24$
	NFC-NFT	$F_{1,57} = 0.20$	$P = 0.66$

Notes: DC = Diurnal Control PAA, DT = Diurnal Treatment PAA, NC = Nocturnal Control PAA and NT = Nocturnal Treatment PAA.

Figure S1: Picture of glass tube with PAA dilution used in the experiment to increase PAA emission.

Table S2: Selection gradient estimates and P-values associated on each measured floral trait for males and for each of the four PAA treatment × exclusion treatment combination.

Traits	β_{DC}	P_{DC}	β_{DT}	P_{DT}	β_{NC}	P_{NC}	β_{NT}	P_{NT}
Flower number	-0.014 ± 0.169	0.934	0.391 ± 0.099	0.001	0.404 ± 0.122	0.003	0.508 ± 0.164	0.005
Gamete number	0.179 ± 0.15	0.244	-0.227 ± 0.12	0.071	0.018 ± 0.132	0.894	-0.024 ± 0.13	0.854
Corolla width	-0.117 ± 0.14	0.412	0.233 ± 0.129	0.082	0.46 ± 0.171	0.012	0.052 ± 0.182	0.778
Calyx height	-0.197 ± 0.205	0.347	-0.258 ± 0.14	0.077	-0.111 ± 0.141	0.436	0.274 ± 0.139	0.061

Notes: DC = Diurnal Control PAA, DT = Diurnal Treatment PAA, NC = Nocturnal Control PAA and NT = Nocturnal Treatment PAA.

Table S3: Selection gradient estimates and P-values associated on each measured floral trait for females and for each of the four PAA treatment × exclusion treatment combination.

Traits	β_{DC}	P_{DC}	β_{DT}	P_{DT}	β_{NC}	P_{NC}	β_{NT}	P_{NT}
Flower number	0.278 ± 0.112	0.021	0.36 ± 0.163	0.037	0.442 ± 0.124	0.002	0.598 ± 0.193	0.005
Gamete number	0.165 ± 0.142	0.259	0.305 ± 0.147	0.049	0.257 ± 0.128	0.057	0.232 ± 0.184	0.219
Corolla width	0.133 ± 0.191	0.493	-0.119 ± 0.179	0.513	0.136 ± 0.155	0.388	-0.078 ± 0.2	0.699
Calyx height	-0.008 ± 0.141	0.953	0.197 ± 0.199	0.333	-0.003 ± 0.155	0.986	0.697 ± 0.264	0.015

Notes: DC = Diurnal Control PAA, DT = Diurnal Treatment PAA, NC = Nocturnal Control PAA and NT = Nocturnal Treatment PAA.

Table S4: Comparison of selection strength between (i) PAA treatment and (ii) exclusion treatment for males.

Interaction	F_C	P_C	F_T	P_T
Flower number × Exclusion	4.038	0.053	0.363	0.55
Gamete number × Exclusion	0.656	0.422	1.295	0.261
Corolla width × Exclusion	6.818	0.012	0.651	0.424
Calyx height × Exclusion	0.119	0.732	7.256	0.01

Interaction	F_D	P_D	F_N	P_N
Flower number × PAA	4.335	0.043	0.257	0.615
Gamete number × PAA	4.487	0.039	0.051	0.822
Corolla width × PAA	3.402	0.071	2.658	0.11
Calyx height × PAA	0.06	0.808	3.788	0.057

Notes: The upper part of the table represents results from ANCOVAs for interactions between the diverse floral traits and exclusion treatment, in control male group with unmanipulated PAA (C) and male group with increased PAA (T). The upper part of the table represents results from ANCOVAs for interactions between the diverse floral traits and PAA treatment, in males exposed to diurnal pollinators (D) and males exposed to nocturnal pollinators (N). F-values and P-values are indicated for each group.

Table S5: Comparison of selection strength between (i) PAA treatment and (ii) exclusion treatment for females.

Interaction	F_C	P_C	F_T	P_T
Flower number × Exclusion	0.939	0.338	0.882	0.352
Gamete number × Exclusion	0.231	0.633	0.096	0.759
Corolla width × Exclusion	0.001	0.99	0.022	0.882
Calyx height × Exclusion	0.001	0.979	2.335	0.133

Interaction	F_D	P_D	F_N	P_N
Flower number × PAA	0.179	0.674	0.459	0.501
Gamete number × PAA	0.463	0.499	0.011	0.917
Corolla width × PAA	0.898	0.348	0.646	0.426
Calyx height × PAA	0.727	0.398	5.373	0.025

Notes: The upper part of the table represents results from ANCOVAs for interactions between the diverse floral traits and exclusion treatment, in control female group with unmanipulated PAA (C) and female group with increased PAA (T). The upper part of the table represents results from ANCOVAs for interactions between the diverse floral traits and PAA treatment, in females exposed to diurnal pollinators (D) and females exposed to nocturnal pollinators (N). F-values and P-values are indicated for each group.

Text S1: Estimating pollen dispersal kernel

The pollen dispersal kernel $F(x)$ for each exclusion treatment (i.e. fecundity probability as a function of pollen dispersal distance) was modeled using the exponential-power function (Klein et al., 2006), given by:

$$F(x) = \frac{1}{(2\pi\alpha^2\Gamma(2))} e(-\frac{x}{\alpha})$$

with x the distance between a male and a potential mother, Γ the Gamma distribution and α being related to the average pollen dispersal distance in fecundity δ for each exclusion treatment with:

$$\alpha = \delta\frac{\Gamma(2)}{\Gamma(3)}$$

References

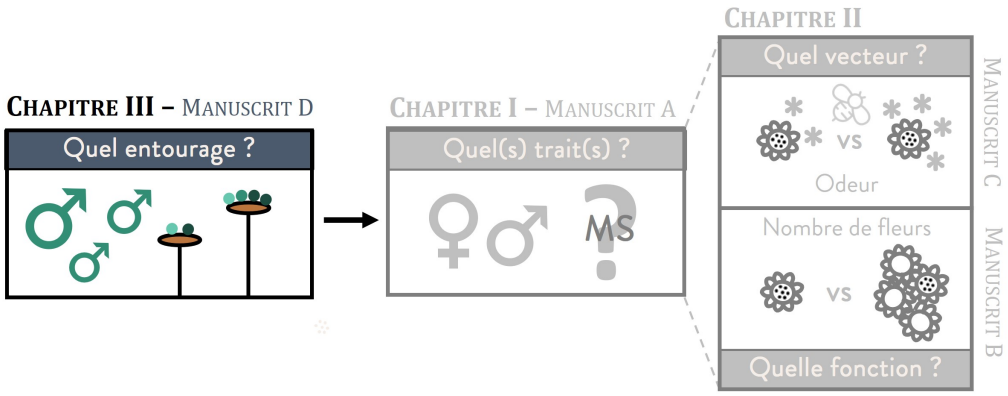
Klein E.K., Lavigne C., Gouyon P-H. (2006). Mixing of propagules from discrete sources at long distance: comparing a dispersal tail to an exponential. *BMC Ecology*, 6:3.

Chapitre III

Accès au pollen *in natura*

Résumé en français du chapitre III

Dans les manuscrits précédents, les conditions démographiques étaient relativement similaires, avec un sexe-ratio équilibré dans toutes les expérimentations ainsi qu'une densité peu variable. Ces conditions démographiques jouent cependant un rôle majeur dans la quantité de gamètes mâles et femelles disponibles pour la reproduction, et donc potentiellement dans l'intensité de la compétition intra-sexuelle et donc de la sélection sexuelle (Ashman & Diefenderfer, 2001). Par ailleurs, la qualité des habitats de ces populations est supposé affecter les communautés de pollinisateurs, qui à leur tour régissent l'importance des transferts de pollen (Schüepp et al., 2014). Dans ce chapitre, nous nous intéressons aux effets des caractéristiques des populations *in natura* sur l'acquisition du pollen chez les femelles. A plus fine échelle, les effets des traits floraux individuels sont également explorés en interaction avec les caractéristiques du voisinage local en termes de densité et sexe-ratio. Il ressort de cette étude qu'il existe une grande variabilité dans la charge pollinique moyenne en fonction des populations, et que celle-ci est majoritairement affectée par le sexe-ratio global de la population. A l'échelle de l'individu, la charge pollinique augmente avec la taille de corolle mais diminue avec le nombre de fleurs. Cet effet est cependant amenuisé lorsque plus de partenaires sexuels sont disponibles aux alentours, suggérant un rôle déterminant du voisinage local dans les effets des traits floraux en termes d'attraction des pollinisateurs.



References

Ashman T-L., Diefenderfer C. (2001). Sex ratio represents a unique context for selection on attractive traits: consequences for the evolution of sexual dimorphism. *The American Naturalist*, 157:334–347.

Schüepp C., Herzog F., Entling M.H. (2014). Disentangling multiple drivers of pollination in a landscape-scale experiment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281:20132667.

- Manuscript D -

Determinants of pollen load variation in natural populations of a dioecious insect-pollinated species

Estelle Barbot[1,3], Mathilde Dufaÿ[2] and Isabelle De Cauwer[1]

Authors affiliation:
[1] Univ. Lille, CNRS, UMR 8198 - Evo-Eco-Paleo, F-59000 Lille, France
[2] CEFE, Univ Montpellier, CNRS, Univ Paul Valéry Montpellier 3, EPHE, IRD, Montpellier, France
[3] Corresponding author: Estelle Barbot, E-mail: estelle.barbot@protonmail.com

In preparation

Contents

Abstract 177
Introduction 179
Material and Methods 180
Plant species 180
Study sites and measurements 181
Mapping analyses 181
Pollen load estimations 182
Statistical analyses 182
Results 184
Populations characteristics 184
Sexual dimorphism among populations 184
Population-level analysis of pollen load variation 184
Fine-scale analysis of pollen load variation 186
Discussion 186
Population characteristics and sexual dimorphism 186
Population-level effects on mean pollen load 188
Fine-scale effects of individual neighborhood' characteristics on mean pollen load 189
Potential effects of pollen load on seed-set 190
Bibliography 191
Supplementary materials 195

Abstract

In insect-pollinated plant populations, pollen load on stigmas should dependent on factors acting at different scales, from the population level (population size, pollinators abundance and habitat quality) to the individual level (floral traits and mate availability in the direct neighbourhood). In dioecious species, pollen load might also vary with sex-ratio and with the degree of sexual dimorphism. In this study, we investigated the impacts of different factors on pollen load, both at large- and fine-scale, in 23 natural populations of the insect-pollinated dioecious species *Silene dioica*. We found high levels of variation in sexual dimorphism among populations, although the structure of this variation depended on the floral trait under scrutiny (flower number or flower size). At the population level, we found that male-biased sex-ratios, as well as average corolla width in males, increased pollen load. On the contrary, at fine-scale, male-biased sex-ratios decreased pollen load, unless focal females had large floral displays. At fine scale, the effect of floral traits on pollen load often varied with characteristics of the immediate neighbourhood (local sex-ratio and density), suggesting that future studies linking floral traits to pollinator attraction should integrate the characteristics of local patch context.

Key words: sexual dimorphism - floral traits - population size - sex-ratio - habitat quality

Introduction

As plants are sessile organisms, limited access to reproduction is likely to play an important role in shaping floral trait evolution. Indeed, traits that increase pollen removal from the male perspective, and pollen receipt from the female perspective, are expected to be under sexual selection because of their potential impact on the access to opposite sex gametes (Moore and Pannell, 2011). Since 85% of angiosperm species are animal-pollinated (Ollerton et al., 2011), floral traits that play a role in pollinator attraction are expected to directly affect mating success (Schiestl and Johnson, 2013). By transferring male gametophytes (i.e. pollen grains) from anthers to receptive female reproductive organs (i.e. stigmas), pollinators thus increase pollen load (i.e. pollen grains quantity on female stigma).

Pollen load is often insufficient to achieve full seed-set, thus resulting in pollen limitation of female reproductive success *in natura* (Burd, 1994; Ashman et al., 2004; Knight et al., 2005). The severity of pollen limitation is known to vary among populations, depending on the number of flowering individuals, individual density and pollinator abundance (González-Varo et al., 2009). With the recent anthropogenic declines in both wild and domesticated pollinators, habitat quality and type of land use could further impact pollen receipt (Biesmeijer, 2006; Potts et al., 2010). Depending on their reproductive system, some plant species could be particularly prone to have their reproductive success diminished. Indeed, in self-incompatible species, monoecious species and dioecious species, only a limited portion of the visits will lead to effective fertilization because the pollinator must have visited either a compatible individual or a male flower earlier in the sequence. In the case of insect-pollinated dioecious species, sexual dimorphism for floral traits, including flower number and size, is a frequent feature of natural populations, with males often being more conspicuous than females, at least in temperate regions (Eckhart, 1999; Barrett and Hough, 2012; Matsuhisa and Ushimaru, 2015). Because these floral traits frequently play a role in pollinator attraction (Goulson, 1999; Chittka and Thomson, 2001), such dimorphism could bias visits towards males. When pollinators are abundant, lower rates of visits on less attractive female flowers do not necessarily translate into lower seed production because each female should still receive enough visits to maximize its reproduction (Vaughton and Ramsey, 1998; Vamosi and Otto, 2002; Abraham, 2005; Glaettli and Barrett, 2008). When pollinators are scarce, however, preferential visits on males could result in inefficient pollen transfer, reduced pollen load, and might ultimately limit plant reproductive success (Vamosi and Otto, 2002).

Factors that could influence pollen load are numerous and range across different scales, from the decisions a given pollinator makes during its visitation sequence to habitat quality and plant population characteristics (Figure 1). At large scale, plant population size and density directly impact mate availability and could thus constitute strong drivers of pollen load. Population size and density could also affect pollinator abundances and diversity because of their link to resource availability, with large and dense populations potentially being more attractive to pollinators (Cheptou and Avendaño, 2006). Another potential driver of pollinator abundance is the quality of the habitat surrounding the plant population. Semi-natural habitats and forests are often associated with good pollination services and high pollen loads (Farwig et al., 2009; Schüepp et al., 2014), while conventional crops have been reported to negatively impact pollen load (Pfister et al., 2018). Finally, existing studies show diverse and sometimes conflicting effects of urban areas on pollinator communities, ranging from positive effects linked to floral resources present in gardens (Loram et al., 2007) to negative effects linked to increased competition between individuals to assess resources (Potts et al., 2010).

In dioecious species, population characteristics further include male availability which is a func-

tion of the total number of individuals and the global sex-ratio. Relative attractiveness of males and females, which is captured by the degree of sexual dimorphism for attractive floral traits, is also likely to impact pollen load if pollinators preferentially visit males. Such sexual dimorphism variation among natural populations (e.g. Yakimowski et al., 2011; Puixeu et al., 2019) could emerge from selection patterns differing between males and females (Delph and Bell, 2008). Under good pollination services (i.e. no pollen limitation), one could expect that male floral phenotypes should vary less among populations than female phenotypes, as a footprint of stronger sexual selection on their traits (Bedhomme et al., 2003).

Beyond these population level factors, the quantity of pollen deposited on a given stigma is also likely to depend on parameters that vary at a much finer spatial scale. Because pollen dispersal distances are generally restricted in natural populations of insect-pollinated plants (Hardy et al., 2004; Llaurens et al., 2008; Van Rossum et al., 2011), neighborhood characteristics (i.e. local density and sex-ratio) around a given pollen recipient could also be crucial in determining pollen load, maybe more than overall population characteristics. Thus, the pollen load on the flowers of a given individual might not only depend on its own floral attributes but also on the availability of sexual partners in the immediate neighborhood.

In this study, we aim at understanding factors influencing mean pollen load at the population large-scale level and factors influencing pollen load at the individual fine-scale level. We sampled stigmas on about ten females in 23 populations of the dioecious insect-pollinated species *Silene dioica* in order to quantify pollen load variation among populations and among individuals within population. We investigated the effects of various population characteristics on mean pollen load: population size, population sex-ratio, degree of sexual dimorphism for two floral traits (flower number and corolla width) and habitat quality, quantified using information about the land use in the vicinity of the population (i.e. semi-natural habitats, forests, crops and urban areas). Because pollen dispersal distances are known to be extremely restricted in our study species, *Silene dioica* (around one meter on average, Barbot et al., in prep. B), we also investigated finer-scale processes by exploring how (i) flower number and corolla width of the recipient female, as well as (ii) local density and sex-ratio in the direct neighborhood around the recipient female, affected pollen load.

Material and Methods

Plant species

Silene dioica is an herbaceous dioecious species with XY sex determination (Warmke, 1946; Ming et al., 2011). This species can be found in forest edges, woodlands and wet meadows, but can also grow in more disturbed habitats, such as roadsides or field edges. Its geographical range expends throughout northern and central Europe (Baker, 1947; Jalas and Suhominen, 1986). In northern France, the species mainly flowers between end-April and mid-July, and its flowering peak occurs by the end of May (pers. obs.). It is a generalist insect-pollinated species, with Syrphidae and *Bombus sp.* described as main diurnal pollinators (Kay et al., 1984; Jürgens et al., 1996; Giménez-Benavides et al., 2007). Female flowers have ovaries that contain on average 250 ovules (Barbot et al., in prep. A).

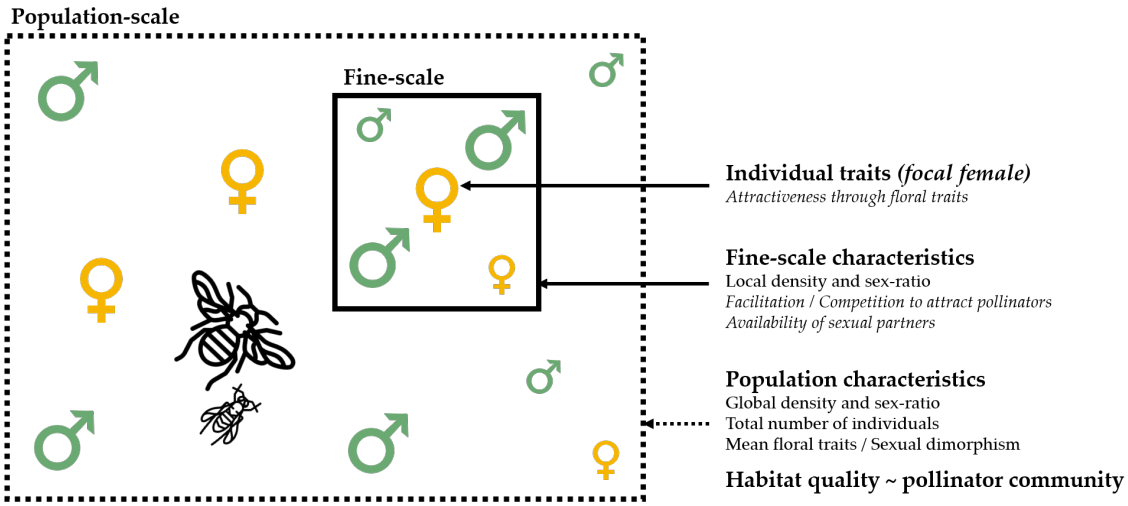


Figure 1: Diagram of the mechanisms at different scales (fine and population-scale) that can affect pollen load in a wild population of a dioecious species. Large symbols represent individuals with very attractive floral traits, whereas small symbols represent individuals with less attractive displays.

Study sites and measurements

A total of 23 populations were sampled in May 2018 and May 2019, at the flowering peak. All surveyed populations were located in northern France and in the Hainaut province in Belgium. Each population was a discrete patch of individuals, and two study sites were considered as distinct populations when separated by at least 500 m. Over the whole data set, pairwise distances varied from 500m to 118km (Table 1; Figure SB2). Sampling was done after at least 24 hours of good weather (sunshine and $> 13°C$). In each population, we counted the total number of flowering individuals, the number of flowering females and males and assessed global sex-ratio (overall proportion of males). Flower number and corolla width (measured on one randomly chosen flower using a digital caliper precise to 0.01 mm) were recorded for ten males and ten females per population, when available. Measured individuals were chosen randomly and distributed homogenously throughout the population. On focal females, the five stigma lobes of one flower were collected and stored in FAA (ethanol 70%, formaldehyde 35% and acetic acid, 8:1:1), which allows long-time conservation of the tissue, without destroying pollen grains before counts (see below). Finally, we also counted the number of males and females in a one-meter radius around each focal female to assess local sex-ratio and density (i.e. number of individuals in the immediate neighborhood).

Mapping analyses

Surface areas of each population were estimated by reporting the GPS coordinates of individuals at the edges in QGIS (version 2.14 'Essen'), which allowed us to assess global density (number of flowering individuals per square meter). To characterize the type of habitats surrounding each population, we ground mapped the distinct land uses around each population in a one km radius in QGIS (Figure SB3), as *Bombus* species rarely forage further than one kilometer (Walther-Hellwig and Frankl, 2000; Wolf and Moritz, 2008). We then calculated the proportions of each habitat in R using package *rgeos* (Bivand et al., 2020; Team, 2019). We used three mapping data sources depending on the location of the population: data from the ARCH project, from the OS Picardie project (both used CORINE biotope typology; Wyatt and Moss, 1991) and from the COSW project. Four habitat

Table 1: DMS coordinates, sample year, population size, global sex-ratio and density for each sampled population.

Population	DMS coordinates	Year	Population size	Global sex-ratio	Density (ind.m^{-1})
ABB1	50°2'7.96"N 3°38'6.51"E	2019	138	0.63	0.74
BOU1	50°0'4.09"N 3°42'3.85"E	2019	31	0.68	4.68
BOU2	50°0'4.19"N 3°41'8.38"E	2019	625	0.67	1.48
BS1	50°28'6.43"N 3°36'0.53"E	2019	39	0.72	0.29
BS2	50°29'2.79"N 3°36'1.96"E	2019	93	0.81	0.99
ETR	49°59'7.67"N 3°39'4.18"E	2019	46	0.72	0.025
FRE	50°33'4.06"N 3°1'2.21"E	2018	54	0.48	1.65
GAU1	50°35'6.43"N 3°29'9.03"E	2019	42	0.64	0.82
NOU1	50°0'3.97"N 3°47'2.12"E	2019	178	0.57	0.56
OIS1	50°1'5.42"N 3°39'7.94"E	2019	125	0.51	0.0060
OIS2	50°1'1.48"N 3°4'4.48"E	2019	139	0.55	0.027
OIS3	50°2'3.17"N 3°39'7.78"E	2019	148	0.59	0.079
ORS1	50°7'0.18"N 3°38'6.08"E	2019	25	0.52	0.97
ORS2	50°5'6.71"N 3°37'9.47"E	2019	59	0.51	0.0055
RP1	50°2'0.06"N 3°18'3.95"E	2019	618	0.64	0.073
RP2	50°26'3.08"N 3°16'0.04"E	2018	10	0.80	0.25
SA2	50°23'7.66"N 3°26'9.03"E	2019	121	0.78	0.92
SA3	50°23'4.54"N 3°26'1.04"E	2018	176	0.83	0.043
SA4	50°25'5.56"N 3°26'6.96"E	2019	31	0.81	7.00
SA5	50°23'3.29"N 3°25'9.85"E	2019	21	0.76	0.17
VEN1	49°59'0.64"N 3°38'4.17"E	2019	7	0.57	1.49
VRE1	50°23'4.69"N 3°13'7.43"E	2018	113	0.74	0.38
VRE2	50°23'4.31"N 3°15'2.75"E	2018	69	0.49	0.31

types were distinguished depending on land-uses: semi-natural, forests, crops and urban (Table SB1; Figure SB3).

Pollen load estimations

Before pollen counts, one of the five stigma lobes was rinsed with demineralized water for one hour, then immersed in a bath of sodium hydroxide (NaOH 4 mol.L^{-1}) during three hours to soften tissues, and finally washed again for one hour in water. Each stigma lobe was then put on a microscope slide and observed using a fluorescence microscope at x50 magnification, highlighting the pollen grains without any coloration (Axio Imager 2; ZEISS, Oberkochen, Germany; Figure SB1). We then took pictures all along the stigma lobe for later counts using ZEN software (ZEISS, Oberkochen, Germany). The number of conspecific pollen grains on each stigma lobe was obtained by summing counts on all pictures taken for each of the 197 females. Within flower, pollen loads were very similar between stigma lobes, as verified on eight individuals ($F_{1,7} = 0.52, P = .47$). An estimate of the pollen load on the whole flower was obtained by multiplying the pollen count on one stigma lobe by five.

Statistical analyses

Quantifying variation in floral traits between sexes and among study sites

We used the modified signed-likelihood ratio test (MSLRT) to test for the equality of coefficient of variation CV for flower number and corolla width between sexes and among populations, using package *cvequality* (Krishnamoorthy and Lee, 2014; Marwik and Krishnamoorthy, 2019). We used the sexual dimorphism index SD_I described in Lovich and Gibbons (1992) to quantify sexual dimorphism

Table 2: Summary of the parameters tested in population-level and individual level models. Factors retained in the model at large-scale are in bold.

Large-scale measures (population level)	Fine-scale measures (individual level)
Mean flower number for males	
Mean flower number for females	
Mean flower number for females	Flower number for focal female
Mean corolla width for males	
Mean corolla width for females	Corolla width for focal female
for flower number	
for corolla width	
Population size	
Global sex-ratio	Local sex-ratio
Global density	Local density
Total number of individuals	
Semi-natural habitat area	
Forest habitat area	
Crop habitat area	
Urban habitat area	

in terms of flower number and corolla width in each population:

$$SD_I = \frac{\text{mean trait for males}}{\text{mean trait for females}} - 1$$

Positive values indicate that the mean of males is larger than the mean for females and negative values indicate the opposite.

Statistical analysis of pollen load variation

A summary of variables measured at the population scale and at the local scale is available in Table 2. All analyses were performed in R 4.0.3 (Team, 2019).

Population-level analysis – Model selection was performed using the *glmulti* package in R to assess which population characteristics best explained variation in mean pollen load among populations (Calcagno and Mazancourt, 2010). Models included main effects only and where compared using the corrected Aikake Information Criterion (AICC), which includes small-sample size bias correction (Burnham and Anderson, 2004; Calcagno and Mazancourt, 2010). Explanatory variables, presented in Table 2, were centered-scaled to allow comparison between effects. Sample year was initially included as a random factor in the best model, but as this did not improve the model (based on Nakagawa's conditional R^2), it was removed from the analysis. Significance of the retained explanatory variables was tested using likelihood ratio tests with restricted maximum likelihood. Normality of residuals and homoscedasticity were verified.

Fine-scale analysis - We built generalized linear mixed models to assess the effects of individual floral traits (i.e. flower number and corolla width), neighborhood characteristics (i.e. local sex-ratio and local density) and their interactions on individual pollen load, following a Poisson distribution with a random effect of population (*lme4* package, Bates et al., 2015). As for the population-level

Table 3: Effect of individual floral traits and local demography characteristics on pollen load.

Predictor	Estimate (± SE)	*P*-values
Flower number	-0.78 ± 0.0059	**<.001**
Corolla width	0.21 ± 0.0049	**<.001**
Local sex-ratio	-0.58 ± 0.0032	**<.001**
Local density	-0.83 ± 0.022	**<.001**
Flower number × corolla width	0.54 ± 0.059	**<.001**
Flower number × local sex-ratio	0.40 ± 0.0065	**<.001**
Flower number × local density	0.032 ± 0.0052	**<.001**
Corolla width × local sex-ratio	0.14 ± 0.031	**<.001**
Corolla width × local density	0.84 ± 0.020	**<.001**
Local sex-ratio × local density	-0.073 ± 0.0052	**<.001**

Notes: *P*-values are obtained using Wald's tests. The proportion of variance explained by fixed effects of the generalized linear model is $R^2 = 0.185$ using marginal Nakagawa's R^2.

analysis described above, including year as a random effect did not improve the model and was thus removed from the analysis. Individual floral traits were standardized by mean population female traits in order to compare the relative effect of an equal percent change in individual floral traits among populations. Local sex-ratio and local density were centered-scaled.

Results

Populations characteristics

Population sizes ranged from 7 individuals (VEN1) to 625 individuals (BOU2; Table 1), with an average of 121.0 ± 31.9 SE individuals. Population sex-ratio (i.e. proportion of males) ranged from 0.48 (FRE) to 0.83 (SA3). Populations were thus generally male-biased with a mean sex-ratio of 0.67 (± 0.025 SE).

Sexual dimorphism among populations

All populations except one (SA3) were sexually dimorphic for flower number, with males having more flowers than females (Figure 2A). The sexual dimorphism index for flower number ranged from 0.03 (SA3) to 14.38 (OIS2;Figure 2A). Among populations, male flower production was also more variable than female flower production ($CV_M = 0.81, CV_F = 0.41; R_{MSLRT} = 5.71, P = 0.016$; Figure 2A). Regarding corolla width, all populations except two (SA4 and VRE1) were also sexually dimorphic, with males having wider corollas (Figure 2B). The sexual dimorphism index SD_I for corolla width ranged from -0.04 (SA4) to 0.37 (BS2; Figure 2B). Among populations, females were marginally more variable for mean corolla width than males ($CV_M = 0.079, CV_F = 0.12; R_{MSLRT} = 3.28, P = 0.065$; Figure 2B).

Population-level analysis of pollen load variation

Mean pollen load per flower was highly variable among the 23 sampled populations, ranging from 48.0 ± 6.0 SE (NOU1) to 1252.0 ± 62.2 SE (ORS1; Figure 3). Among populations, pollen load variation was best explained by mean corolla width of males and global sex-ratio (marginal Nakagawa's $R^2 = 0.309$; Figure 4). Male-biased sex-ratios significantly increased pollen load ($\beta = 214.34, \chi_{1,22} = 7.15, P < .01$), as did males' mean corolla width ($\beta = 128.28, \chi_{1,22} = 3.90, P = .048$).

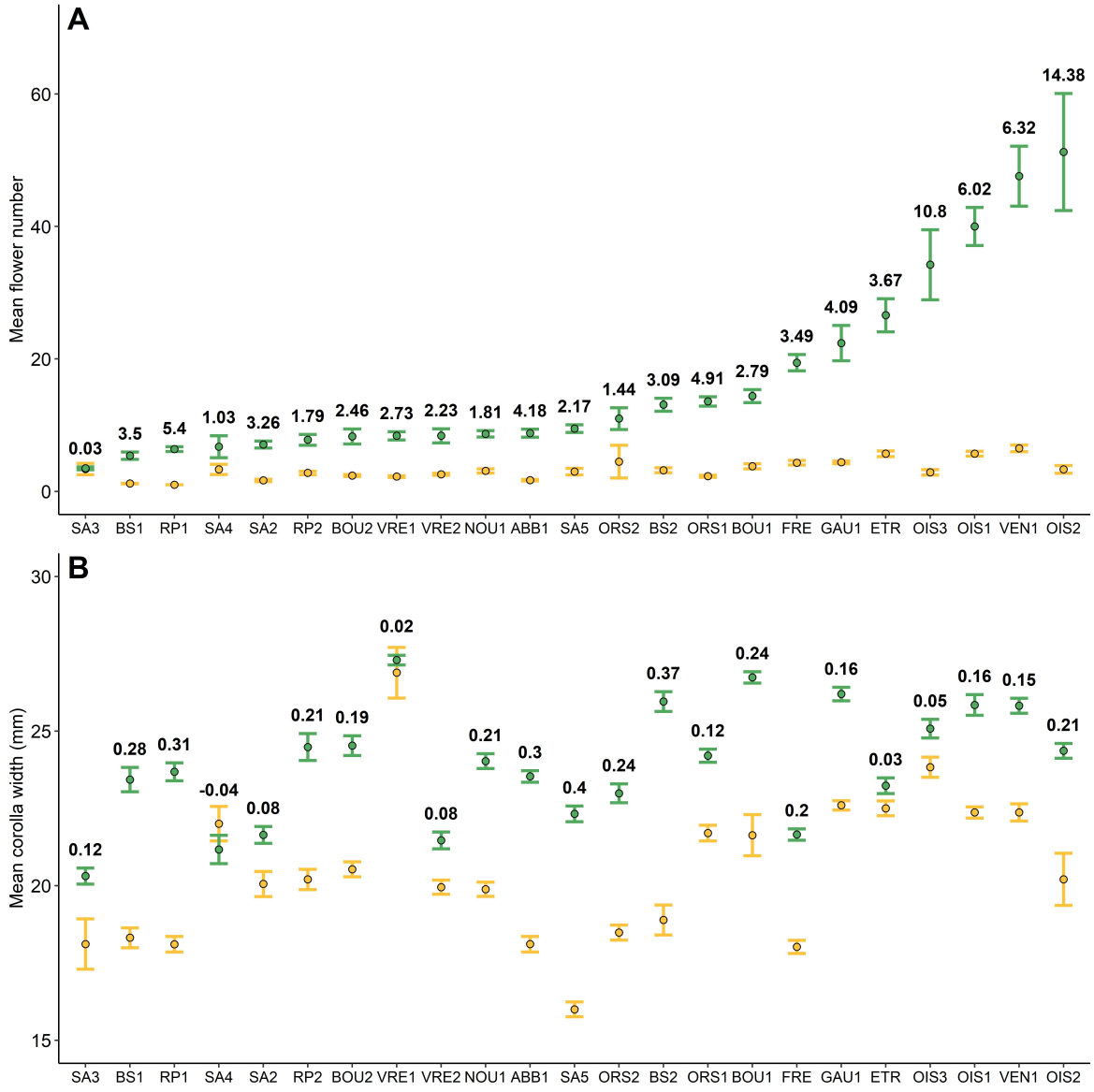


Figure 2: (A) Mean flower number (± SE) and (B) mean corolla width for males (green) and females (yellow) for all 23 surveyed populations. Sexual dimorphism indexes (i.e. mean floral trait for males divided by mean floral trait for females, minus one) are shown above error-bars. Populations are ranked from the least to the most dimorphic in terms of flower number.

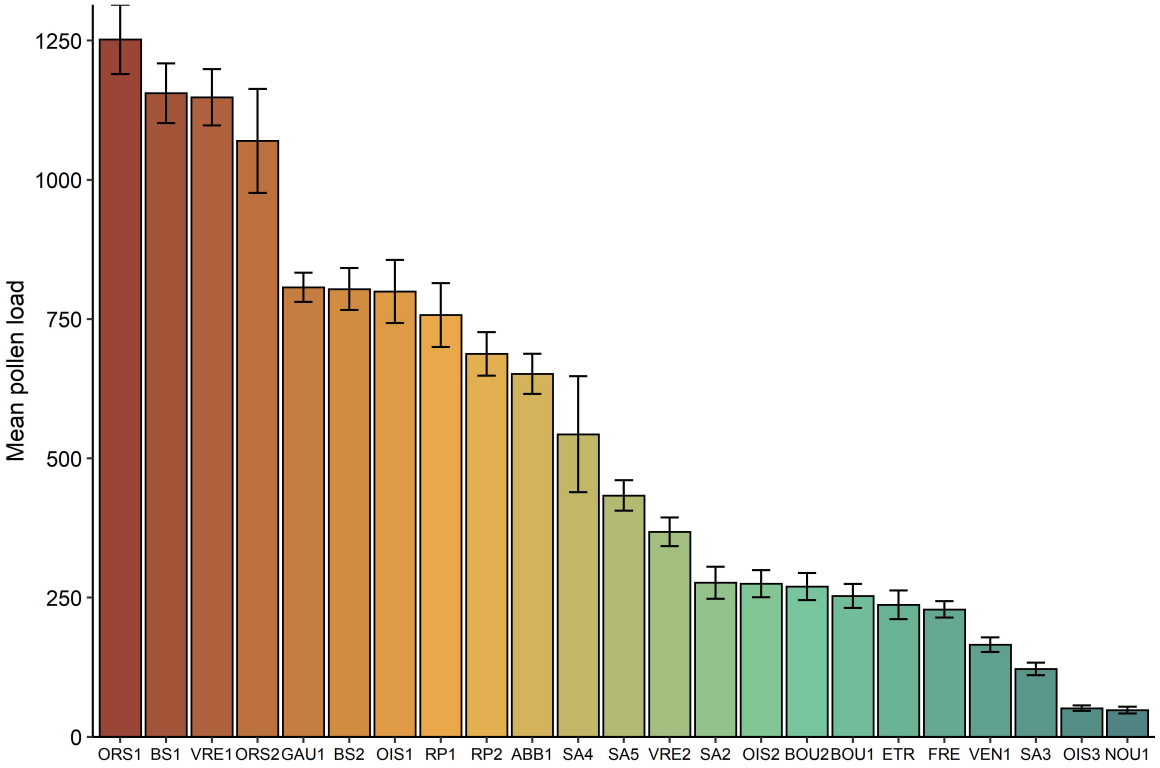


Figure 3: Mean pollen load per flower (± SE) in the 23 sampled populations, ranked from the highest to the lowest value.

Fine-scale analysis of pollen load variation

Flower number carried by the focal females, local sex-ratios and local density all decreased pollen load, while corolla width of the focal females increased pollen load (Table 3). The negative effect of carrying numerous flowers was offset in the females who also had wide corollas, as shown by the interaction between flower number and corolla width (Figure 5A). Similarly, the negative effect of local density on pollen load was weaker when focal females had numerous flowers (Figure 5B) and the negative effect of local sex-ratio was weaker when focal females had wider corollas (Figure 5E). Interestingly, the negative effect of local sex-ratio became positive when associated with high flower numbers (Figure 5C), and the negative effect of local density also became positive when associated with wider corollas (Figure 5D). Females surrounded by more males, independently of their floral traits, had lower pollen loads, as shown by the interaction between local sex-ratio and local density (Figure 5F).

Discussion

Surveying pollen load in 23 natural populations of *S. dioica* in northern France and Belgium allowed identifying factors impacting pollen availability among and within populations.

Population characteristics and sexual dimorphism

While population size strongly varied across sampled sites, sex-ratio was almost always male biased. In *Silene dioica*, males flower earlier and longer than females (Moquet et al., 2020) and this differ-

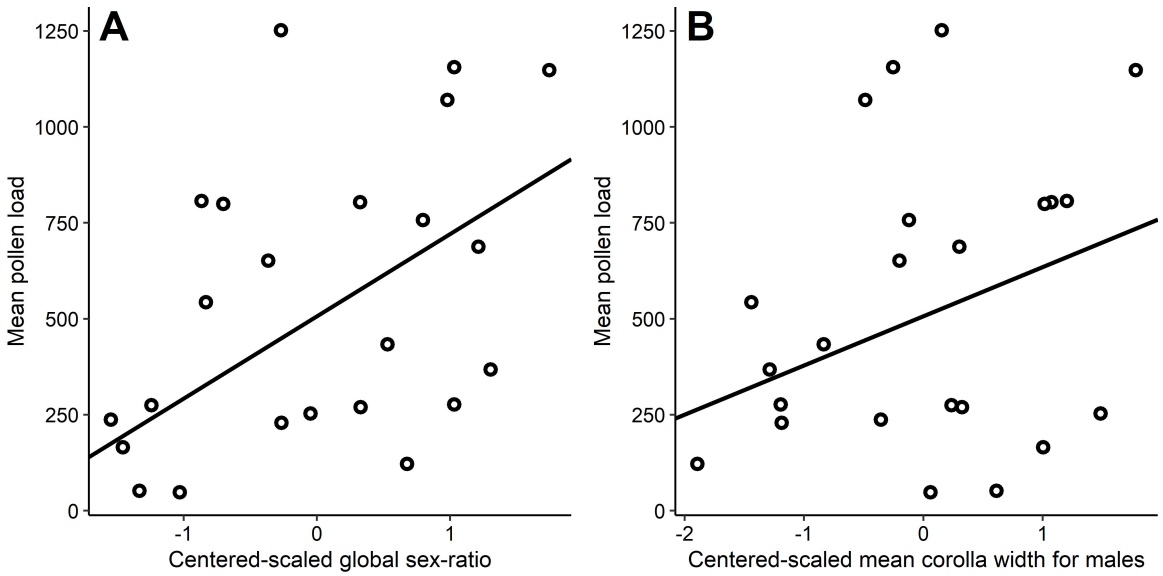


Figure 4: Effects of (A) population-level sex-ratio and (B) mean males' corolla widths on mean pollen-load at the population level. Both slopes are significantly positive.

ence in phenology between sexes could generate male-biased sex-ratio when assessing the Operational Sex-Ratio (OSR, the ratio of ready-to-mate individuals in each sex; Emlen and Oring, 1977) at any given time point. It has been suggested that population sex-ratio could influence sex-specific selection on floral traits, because it impacts the number of ovules available and thus the level of male-male competition to access ovules (Ashman and Diefenderfer, 2001; Puixeu et al., 2019). With male-biased OSR, it is thus likely that males' floral traits are under stronger selection than females' floral traits to attract pollinators, although complementary measures (e.g. Bateman's gradient) are needed to achieve this conclusion (Kokko et al., 2012).

In line with the idea of a stronger selection on floral traits in males than in females, we found consistent patterns of sexual dimorphism, with males being more conspicuous than females in the vast majority of studied populations. Another interesting observation was that sexual dimorphism varied widely among study sites, as reported in other studies (e.g. Yakimowski et al., 2011; Puixeu et al., 2019. Four non-mutually exclusive explanations could account for this finding. First, this variation could arise as a consequence of the demographic history of our populations and the resulting genetic drift. Second, this variation potentially reflects variation in selection strength across the landscape. In *S. dioica*, petal length (which is positively correlated to corolla width) was shown to display a high narrow-sense heritability in a controlled environment (0.71 $\pm$ 0.28 SE; Giles et al., 2006), suggesting that this trait could evolve quickly in response to fluctuations in the pollination context. If one sex showed a stronger evolutionary response to such fluctuation (presumably males, because their reproductive success is expected to be more limited by pollinator availability than in females), one would expect among population variation in sexual dimorphism. Third, sexual dimorphism is known to fluctuate during the flowering season in the study species (Moquet et al., 2020). Although we attempted to sample populations as close as possible to the flowering peak, it is likely that a part of the observed variation in sexual dimorphism was due to variations in the exact phenological stage at which we sampled the study sites. Finally, sex-specific and/or population-specific phenotypic plasticity could also result in the observed variation in sexual dimorphism among populations. In the sister species *Silene latifolia*, among populations variations in sexual dimorphism for floral traits was assessed in

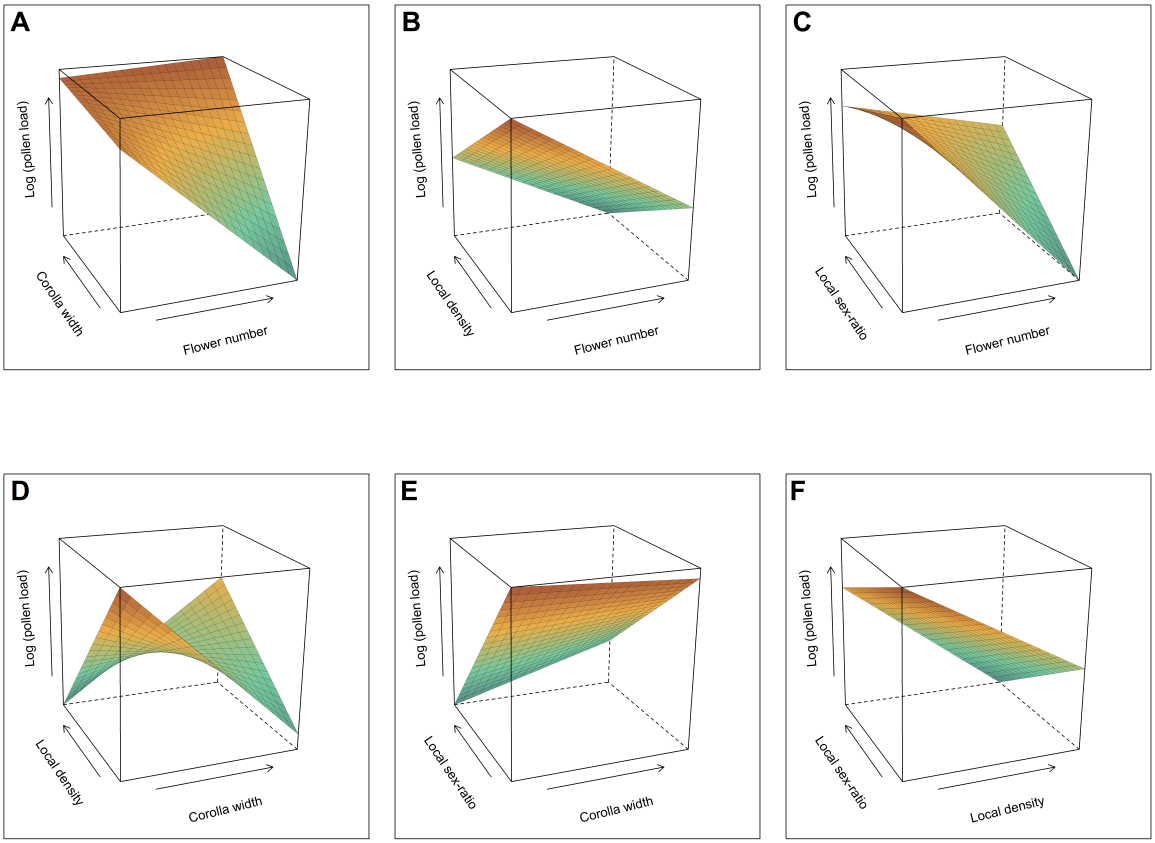


Figure 5: Interaction effects on pollen load (log-scaled) between (A) flower number and corolla width, (B) flower number and local density, (C) flower number and local sex-ratio, (D) corolla width and local density, (E) corolla width and local sex-ratio and (F) local density and local sex-ratio. Cold colors represent low pollen load values whereas warm colors represent high pollen load values.

controlled conditions and was not explained by differential phenotypic plasticity among those populations (Delph and Bell, 2008). Repeated measures across the flowering season in controlled conditions would be necessary to quantify how much of the variation observed in natura can be ascribed to (i) differences in flowering phenology between sexes, (ii) phenotypic plasticity and (iii) genetic differences (Puixeu et al., 2019).

Population-level effects on mean pollen load

It has been advocated that population size and pollinator abundance could be positively correlated, because sites with more individuals are more attractive to pollinators (Cheptou and Avendaño, 2006; Delmas et al., 2016). This could potentially result in higher mean pollen loads, although high densities are also likely to generate stronger competition among individuals for access to pollinators. Here, we did not find any effect of population size or density on mean pollen load at the population level. Nonetheless, we did find a positive effect of sex-ratio. As pollinators are more attracted by male flowers than female flowers in *Silene dioica* (Carlsson-Granér et al., 1998), this may suggest that pollinator attraction to populations increases with the degree of male-bias in global sex-ratio. Male-biased sex-ratios could positively impact mean pollen load, because (i) it attracts more pollinators

through higher floral display and through pollen reward, and/or (ii) because it increases overall pollen availability at the population level, maybe also increasing pollen quantity on pollinators' bodies when visiting females.

Moreover, we found that males' mean corolla width increased pollen load at the population level. In a previous study investigating selection gradients on floral traits, we found a weak positive selection gradient on flower size in males (Barbot et al., in prep. A), a result that could be explained by a higher ability for males with larger flowers to export their pollen, either because they are more attractive for pollinators or because large flowers provide a better fit between the anthers and the pollinator's body (Hodgins and Barrett, 2008; Barrio and Teixido, 2015). Although these two studies were carried at different scales, the same mechanisms could act at the population level: populations with large-flowered males could be characterized by higher mean pollen export, thus resulting in higher mean pollen load.

Finally, at population level, we found no effect of habitat quality on mean pollen-load. Although previous studies found an effect of habitat on pollinator decline (reviewed in Potts et al., 2010, we did not directly assess pollinator abundance and diversity. Thus, our habitat characterizations could have no effect on pollinator communities, or there might have been compensation effects as already shown in urban areas (Loram et al., 2007; Banaszak-Cibicka and Żmihorski, 2012). The fact that one of the major pollinators of *Silene dioica* is *Bombus terrestris*, an opportunistic species, might also lead to unexpectedly high pollen loads even in strongly anthropized habitats (Kay et al., 1984; Hingston et al., 2002). Habitat effects on mean pollen-load will need to be coupled with pollinator communities' description in future studies in natural populations of *Silene dioica*.

Fine-scale effects of individual neighborhood' characteristics on mean pollen load

Individual floral traits affected pollen receipt on focal females: while wider corollas increased pollen load, carrying many flowers had the opposite effect. These conflicting effects of flower size and number, both potentially attractive traits, have also been reported in another dioecious species, *Wurmbea dioica* (Vaughton and Ramsey, 1998). While flower number is known to play an important role in pollinator attraction (Klinkhamer and de Jong, 1990; Conner and Rush, 1996; Bond and Maze, 1999), it is likely to decrease pollen load per flower because of an increased frequency of within-individual flower visits by pollinators (Brys and Jacquemyn, 2009). On the contrary, corolla width is likely to increase pollen load by attracting more pollinators, particularly at high local densities. Inter-individual competition within patches to attract pollinators might indeed mean that carrying large flowers becomes even more important when density is high.

Interestingly, both the positive effect of corolla width and the negative effect of flower number on pollen load depended on the availability of male plants in the direct vicinity. On one hand, the possible benefits of carrying wider corollas in terms of pollinator attraction could lead to disproportionately higher pollen loads when pollinators have visited many male flowers and carry high quantities of pollen grains. One the other hand, even if carrying a lot of flowers could lead to higher within-individual visitation rates (thus reducing effective pollen transfer), this effect may be mitigated when pollinators carry more pollen.

Independently of focal females' floral traits, neighborhood characteristics had a strong effect on pollen load. Local density decreased pollen load, which could be explained by the fact that dense

patches, albeit being potentially more attractive to pollinators, also contain more flowers. This potentially decrease visitation rate per flower, an effect that has been described in *Rhododendron ferrugineum* (Delmas et al., 2016). Interestingly, sex-ratio, which had a positive effect on pollen load at the population level, was found to negatively affect pollen receipt at the local scale. While the positive effect at the population-scale might be explained by an increase in the overall gametes availability and/or an increase of pollinator availability, the negative effect at local scale could reflect inter-individual competition for access to pollinators. Indeed, another study showed that *Silene dioica* females were less visited than males when accounting for the ratio of male to female flowers in the population (Carlsson-Granér et al., 1998). Thus, a female surrounded by many conspicuous males could be avoided by pollinators, thus reducing its pollen load. Even if the effects of neighborhood characteristics on pollen load are not straightforward to understand, their strength is not surprising: pollen dispersal distances are very restricted in the study species, on average around one meter around males (Barbot et al., in prep. B). The fact that *Bombus species* is one of the main pollinators of *Silene dioica* (Kay et al., 1984) and that it shows patch constancy in its forage behavior (Goulson, 1999), could explain the limited pollen dispersal distances, as well as the strength of fine-scale effects documented in the current study.

Potential effects of pollen load on seed-set

Whether or not the among populations and among individual variations in pollen load that were reported here would translate into seed-set variations remains an open question. This would depend on the nature of the relationship between the quantity of pollen grains deposited on stigmas and the number of seeds produced, which should in turn depend, among other processes, on the proportion of viable pollen grains, as well as on the resource available to females for seed maturation. For example, another study reported strong differences in mean pollen load between wild populations of Allium stellatum without any evidence of pollen limitation in those populations (Molano-Flores et al., 1999). Moreover, although our results support a positive effect of corolla width on individual pollen load, a previous study showed that this trait did not impact female reproductive output in an experimental population placed in optimal pollination conditions (Barbot et al., in prep. A). Concerning flower number, although we reported here a negative effect on pollen load, a female producing a lot of flowers could also carry more fruits, which could result in higher seed production even if there is a lower seed-set per fruit. In the present study, we did not assess seed-set. Nonetheless, given that ovaries contain on average 250 ovules in the study species, and under the hypothesis that the flowers we sampled in natura would not have received additionnal pollinator visits, it seems plausible that some populations and/or individuals would not have achieved full seed-set (Text SA1, Figure SA1). More studies will be necessary to properly assess the level of pollen limitation in the wild and to determine if the effects reported here in terms of pollen load could have impacts on population dynamics, as well as on the evolution of attractive floral traits in *S. dioica*. While we cannot conclude to fitness consequences of the estimated effects, this study paves the way for in-depth future controlled studies to better disentangle mechanisms affecting pollen limitation and sex-specific selection in the dioecious species *Silene dioica*.

Acknowledgments

We thank E. Schmidt, V. Mahut, P. Tendron and R. Boisserie for help with data collection in the field, as well as help with data treatment and analysis. We thank the Service Public de Wallonie as well as the CORINE Biotope project for mapping data.

Funding

This work is a contribution to the CPER research project CLIMIBIO. The authors thank the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Hauts de France Region and the European Funds for Regional Economical Development for their financial support to this project.

References

Abraham, J. N. (2005). Insect choice and floral size dimorphism: sexual selection or natural selection? *Journal of Insect Behavior*, 18:743–756.

Ashman, T.-L. and Diefenderfer, C. (2001). Sex ratio represents a unique context for selection on attractive traits: consequences for the evolution of sexual dimorphism. *The American Naturalist*, 157:334–347.

Ashman, T.-L., Knight, T. M., Steets, J. A., Amarasekare, P., Burd, M., Campbell, D. R., Dudash, M. R., Johnston, M. O., Mazer, S. J., Mitchell, R. J., Morgan, M. T., and Wilson, W. G. (2004). Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 85:2408–2421.

Baker, H. G. (1947). *Melandrium dioicum* (L. emend) Coss. & Germ. *Journal of Ecology*, 35:283–292.

Banaszak-Cibicka, W. and Żmihorski, M. (2012). Wild bees along an urban gradient: winners and losers. *Journal of Insect Conservation*, 16:331–343.

Barbot, E., Dufaÿ, M., and De Cauwer, I. (in prep. A). Natural and sexual selection in an insect-pollinated plant.

Barbot, E., Dufaÿ, M., Tonnabel, J., Godé, C., and De Cauwer, I. (in prep. B). On the function of flower number: disentangling fertility from pollinator-mediated sexual and natural selection.

Barrett, S. C. H. and Hough, J. (2012). Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany*, 64:67–82.

Barrio, M. and Teixido, A. L. (2015). Sex-dependent selection on flower size in a large-flowered Mediterranean species: an experimental approach with *Cistus ladanifer*. *Plant Systematics and Evolution*, 301:113–124.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., and Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using *lme4*. *Journal of Statistical Software*, 67:1–48.

Bedhomme, S., Agnew, P., Sidobre, C., and Michalakis, Y. (2003). Sex-specific reaction norms to intraspecific larval competition in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Evolutionary Biology*, 16:721–730.

Biesmeijer, J. C. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313:351–354.

Bivand, R., Rundel, C., Pebesma, E., Stuetz, R., Hufthammer, K. O., Giraudoux, P., Davis, M., and Santilli, S. (2020). *rgeos*: Interface to Geometry Engine - Open Source ('GEOS').

Bond, W. J. and Maze, K. E. (1999). Survival costs and reproductive benefits of floral display in a sexually dimorphic dioecious shrub, *Leucadendron xanthoconus*. *Evolutionary Ecology*, 13:1–18.

Brys, R. and Jacquemyn, H. (2009). Floral display size and spatial distribution of potential mates affect pollen deposition and female reproductive success in distylous *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Plant Biology*, 12:597–603.

Burd, M. (1994). Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. *The Botanical Review*, 60:83–139.

Burnham, K. P. and Anderson, D. R. (2004). Multimodel inference: understanding AIC and BIC in model selection. *Sociological Methods & Research*, 33:261–304.

Calcagno, V. and Mazancourt, C. d. (2010). *glmulti*: an R package for easy automated model selection with (generalized) linear models. *Journal of Statistical Software*, 34:1–29.

Carlsson-Granér, U., Elmqvist, Ågren, J., Gardfjell, and Ingvarsson (1998). Floral sex ratios, disease and seed set in dioecious *Silene dioica*. *Journal of Ecology*, 86:79–91.

Cheptou, P.-O. and Avendaño, L. G. (2006). Pollination processes and the Allee effect in highly fragmented populations: consequences for the mating system in urban environments. *New Phytologist*, 172:774–783.

Chittka, L. and Thomson, J. D. (2001). Behavioral responses of pollinators to variation in floral display size and their influences on the evolution of floral traits. In *Cognitive ecology of pollination - animal behavior and floral evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.

Conner, J. K. and Rush, S. (1996). Effects of flower size and number on pollinator visitation to wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia*, 105:509–516.

Delmas, C. E. L., Fort, T. L. C., Escaravage, N., and Pornon, A. (2016). Pollen transfer in fragmented plant populations: insight from the pollen loads of pollinators and stigmas in a mass-flowering species. *Ecology and Evolution*, 6:5663–5673.

Delph, L. F. and Bell, D. L. (2008). A test of the differential-plasticity hypothesis for variation in the degree of sexual dimorphism in *Silene latifolia*. *Evolutionary Ecology Research*, 10:61–75.

Eckhart, V. M. (1999). Sexual dimorphism in flowers and inflorescences. In *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin.

Emlen, S. and Oring, L. (1977). Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, 197:215–223.

Farwig, N., Bailey, D., Bochud, E., Herrmann, J. D., Kindler, E., Reusser, N., Schüepp, C., and Schmidt-Entling, M. H. (2009). Isolation from forest reduces pollination, seed predation and insect scavenging in Swiss farmland. *Landscape Ecology*, 24:919–927.

Giles, B. E., Pettersson, T. M., Carlsson-Granér, U., and Ingvarsson, P. K. (2006). Natural selection on floral traits of female *Silene dioica* by a sexually transmitted disease. *New Phytologist*, 169:729–739.

Giménez-Benavides, L., Dötterl, S., Jürgens, A., Escudero, A., and Iriondo, J. M. (2007). Generalist diurnal pollination provides greater fitness in a plant with nocturnal pollination syndrome: assessing the effects of a *Silene-Hadena* interaction. *Oikos*, 116:1461–1472.

Glaettli, M. and Barrett, S. C. H. (2008). Pollinator responses to variation in floral display and flower size in dioecious *Sagittaria latifolia* (Alismataceae). *New Phytologist*, 179:1193–1201.

González-Varo, J. P., Arroyo, J., and Aparicio, A. (2009). Effects of fragmentation on pollinator assemblage, pollen limitation and seed production of Mediterranean myrtle (*Myrtus communis*). *Biological Conservation*, 142:1058–1065.

Goulson, D. (1999). Foraging strategies of insects for gathering nectar and pollen, and implications for plant ecology and evolution. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 2:185–209.

Hardy, O. J., González-Martínez, S. C., Fréville, H., Boquien, G., Mignot, A., Colas, B., and Olivieri, I. (2004). Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae) I. Pattern of pollen dispersal. *Journal of Evolutionary Biology*, 17:795–806.

Hingston, A. B., Marsden-Smedley, J., Driscoll, D. A., Corbett, S., Fenton, J., Anderson, R., Plowman, C., Mowling, F., Jenkin, M., Matsui, K., Bonham, K. J., Ilowski, M., Mcquillan, P. B., Yaxley, B., Reid, T., Storey, D., Poole, L., Mallick, S. A., Fitzgerald, N., Kirkpatrick, J. B., Febey, J., Harwood, A. G., Michaels, K. F., Russell, M. J., Black, P. G., Emmerson, L., Visoiu, M., Morgan, J., Breen, S., Gates, S., Bantich, M. N., and Desmarchelier, J. M. (2002). Extent of invasion of Tasmanian native vegetation by the exotic bumblebee *Bombus terrestris* (Apoidea: Apidae). *Austral Ecology*, 27:162–172.

Hodgins, K. A. and Barrett, S. C. H. (2008). Natural selection on floral traits through male and female function in wild populations of the heterostylous daffodil *Narcissus triandrus*. *Evolution*, 62:1751–1763.

Jalas, J. and Suhominen, J. (1986). *Atlas florae europaeae: distribution of vascular plants in Europe. 7. Caryophyllaceae (Silenoideae)*. Cambridge University Press, Cambridge.

Jürgens, A., Witt, T., and Gottsberger, G. (1996). Reproduction and pollination in Central European populations of *Silene* and *Saponaria* species. *Botanica Acta*, 109:316–324.

Kay, Q. O. N., Lack, A. J., Bamber, F. C., and Davies, C. R. (1984). Differences between sexes in floral morphology, nectar production and insect visits in a dioecious species, *Silene dioica*. *New Phytologist*, 98:515–529.

Klinkhamer, P. G. L. and de Jong, T. J. (1990). Effects of plant size, plant density and sex differential nectar reward on pollinator visitation in the protandrous *Echium vulgare* (boraginaceae). *Oikos*, 57:399–405.

Knight, T. M., Steets, J. A., Vamosi, J. C., Mazer, S. J., Burd, M., Campbell, D. R., Dudash, M. R., Johnston, M. O., Mitchell, R. J., and Ashman, T.-L. (2005). Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36:467–497.

Kokko, H., Klug, H., and Jennions, M. D. (2012). Unifying cornerstones of sexual selection: operational sex ratio, Bateman gradient and the scope for competitive investment. *Ecology Letters*, 15:1340–1351.

Krishnamoorthy, K. and Lee, M. (2014). Improved tests for the equality of normal coefficients of variation. *Computational Statistics*, 29:215–232.

Llaurens, V., Castric, V., Austerlitz, F., and Vekemans, X. (2008). High paternal diversity in the self-incompatible herb *Arabidopsis halleri* despite clonal reproduction and spatially restricted pollen dispersal. *Molecular Ecology*, 17:1577–1588.

Loram, A., Tratalos, J., Warren, P. H., and Gaston, K. J. (2007). Urban domestic gardens (X): the extent & structure of the resource in five major cities. *Landscape Ecology*, 22:601–615.

Lovich, J. E. and Gibbons, J. W. (1992). A review of techniques for quantifying sexual size dimorphism. *Growth, development, and aging: GDA*, 56:269–281.

Marwik, B. and Krishnamoorthy, K. (2019). *cvequality*: tests for the equality of coefficients of variation from multiple groups. R package version 0.1.3.

Matsuhisa, S. and Ushimaru, A. (2015). Sexual dimorphism in floral longevity and flowering synchrony in relation to pollination and mating success in three dioecious *Ilex* species. *American Journal of Botany*, 102:1187–1197.

Ming, R., Bendahmane, A., and Renner, S. S. (2011). Sex chromosomes in land plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62:485–514.

Molano-Flores, B., Hendrix, S. D., and Heard, S. B. (1999). The effect of population size on stigma pollen load, fruit set, and seed set in *Allium stellatum* ker. (Liliaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 160:753–757.

Moore, J. C. and Pannell, J. R. (2011). Sexual selection in plants. *Current Biology*, 21:R176–R182.

Moquet, L., Lateur, L., Jacquemart, A.-L., De Cauwer, I., and Düfay, M. (2020). Temporal dynamics of sexual dimorphism in a dioecious species. *Annals of Botany*, 126:471–480.

Ollerton, J., Winfree, R., and Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120:321–326.

Pfister, S. C., Eckerter, P. W., Krebs, J., Cresswell, J. E., Schirmel, J., and Entling, M. H. (2018). Dominance of cropland reduces the pollen deposition from bumble bees. *Scientific Reports*, 8:13873.

Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., and Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25:345–353.

Puixeu, G., Pickup, M., Field, D. L., and Barrett, S. C. H. (2019). Variation in sexual dimorphism in a wind-pollinated plant: the influence of geographical context and life-cycle dynamics. *New Phytologist*, 224:1108–1120.

Schiestl, F. P. and Johnson, S. D. (2013). Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology & Evolution*, 28:307–315.

Schüepp, C., Herzog, F., and Entling, M. H. (2014). Disentangling multiple drivers of pollination in a landscape-scale experiment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281:20132667.

Team, R. D. C. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Vamosi, J. C. and Otto, S. P. (2002). When looks can kill: the evolution of sexually dimorphic floral display

and the extinction of dioecious plants. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269:1187–1194.

Van Rossum, F., Stiers, I., Van Geert, A., Triest, L., and Hardy, O. J. (2011). Fluorescent dye particles as pollen analogues for measuring pollen dispersal in an insect-pollinated forest herb. *Oecologia*, 165:663–674.

Vaughton, G. and Ramsey, M. (1998). Floral display, pollinator visitation and reproductive success in the dioecious perennial herb *Wurmbea dioica* (Liliaceae). *Oecologia*, 115:93–101.

Walther-Hellwig, K. and Frankl, R. (2000). Foraging habitats and foraging distances of bumblebees, *Bombus spp.* (Hym., Apidae), in an agricultural landscape. *Journal of Applied Entomology*, 124:299–306.

Warmke, H. E. (1946). Sex determination and sex balance in *Melandrium*. *American Journal of Botany*, 33:648–660.

Wolf, S. and Moritz, R. F. (2008). Foraging distance in *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 39:419–427.

Wyatt, B. and Moss, D. (1991). CORINE Biotopes Project - inventory of sites of major importance for nature conservation in the European Community.

Yakimowski, S. B., Glaettli, M., and Barrett, S. C. H. (2011). Floral dimorphism in plant populations with combined versus separate sexes. *Annals of Botany*, 108:765–776.

Supplementary material

Appendix A

Text SA1: Relationship between pollen load and seed number

We did not assess the number of seeds produced in our survey on natural population, nor compare it to hand-pollinated females with stigma saturated in pollen. Thus, because we only measure pollen load, we cannot conclude on the presence or not of pollen limitation. Nonetheless, *Silene dioica* fruits contains on average 251.69 ± 43.69 SD ovules (Barbot et al., in prep. A). Using our estimate of pollen load, if there is less than 250 pollen grains and if flowers are not more visited by pollinators, it is then possible that there is pollen limitation for female reproductive success. We further verified this by assessing the relationship between pollen load and seed number in controlled conditions: the lower the slope is, the more pollen grains are needed to achieve full seed-set. We conducted standardized hand-pollinations in the greenhouse located on the campus of Lille University in France (50°36'27.9"N 3°08'36.3"E). We randomly chose 24 females in our collection, and we hand-pollinated three flowers per female using three treatments: low, medium and high pollen load. As male quality can also have an effect on seed production (Marshall et al., 2007), we chose randomly flowers from five different males. Pollen was initially deposited on a petri dish, and we used an eyelash mounted on a small handle under a binocular magnifier to verify the amount of pollen deposited on stigma. Once fruits were initiated, stigma lobes were removed and stored in FAA for pollen load counts, using the same method as for natural populations. Fruits were then collected at maturity, and dissected to assess seeds number with fruit content imaging using a high resolution scanner (Epson Perfection V700 Photo, Seiko 193 Epson, Suwa, Japan) and digital image processing (*EBImage* package in R; Pau et al., 2010).

We then build a generalized linear mixed model to estimate the effect of pollen load on seed production, with a random effect of the female and using Poisson distribution (*lme4* package, Bates et al., 2015). We found a positive relationship between pollen load and seed number, with an intercept $\mu = 2.65$ ($P < .001$) and a slope $\beta = 0.00595$ ($P < .001$) under log-scale. On average, n pollen grains thus give$e^{(}2.6 + 0.00595 \times n)$ seeds to set Figure SA1.

References

Barbot, E., Dufaÿ, M., and De Cauwer, I. (in prep. A). Natural and sexual selection in an insect-pollinated plant.

Bates D., Mächler M., Bolker B., Walker S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using *lme4*. *Journal of Statistical Software*, 67:1–48.

Marshall D.L., Shaner M.G.M., Oliva J-P. (2007). Effects of pollen load size on seed paternity in *wild radish*: the roles of pollen competition and mate choice. *Evolution*, 61:1925–1937.

Pau G., Fuchs F., Sklyar O., Boutros M., Huber W. (2010). *EBImage* - an R package for image processing with applications to cellular phenotypes. *Bioinformatics*, 26:979–981.

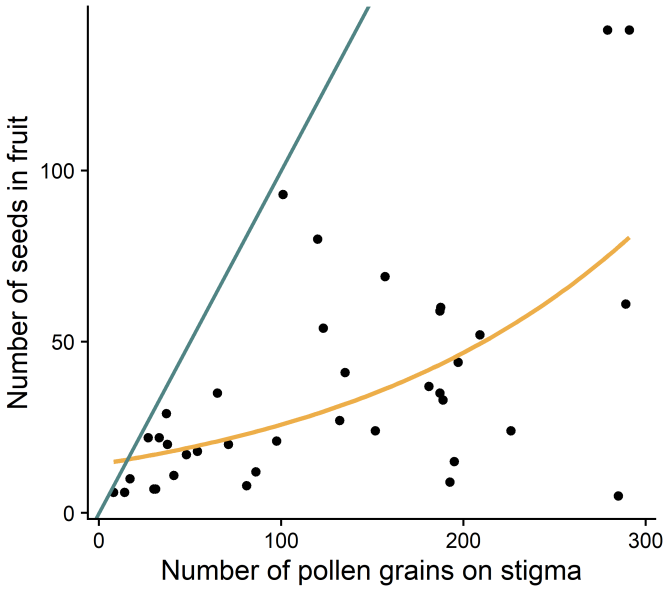


Figure SA1: Relationship between pollen load and seeds number from hand-pollinations. A linear relationship in which each pollen grain sires one ovule and thus give one seed is represented with the blue line. Our estimation of pollen load effect on seed number from generalized linear mixed model is plotted with the yellow line.

Appendix B

Table SB1: Grouping of the different types of land use in four habitats (semi-natural, forests, crops and urban) according to mapping data project.

	ARCH	**OS Picardie**	**COSW**
Semi-natural	Wet meadows Mesophilic meadows Mesophilic pastures Forage meadows Grassy strips Bushes Brownfields Improved meadows Wet tall grass meadows Vegetation belts Submerged vegetation	Natural laws and meadows Meadows Valley floor meadows Moors and bushes	Abandoned lands Brownfields Fallow lands Temporary meadows Permanent meadows
Forests	Deciduous forests Conifers plantations Polderian forests Riparian forests	Valley floor deciduous forests Deciduous forests Conifers forests Mixed forests Harvested forests	Deciduous forests Conifers forests Mixed forests Forests
Crops	Orchards Young plantations Poplars plantations Indeterminate plantations Crops	Plots and crops systems Familial gardens Orchards Vineyards Nurseries, market gardening, greenhouses Arable lands	Market gardening Arable lands Crops
Urban	Roadsides Urban parks Road networks Towns, villages Industrial sites	Railway infrastructures Roadway infrastructures Urban green spaces Landfills Encampment Cemeteries Airports Building sites Commercial zones Industrial zones Sport equipments Urban fabric Rural habitats Historic habitats Large building complexes Administration complexes	Industrial activities Landfills Active quarries Farm buildings Sport equipments Stores Urban fabric

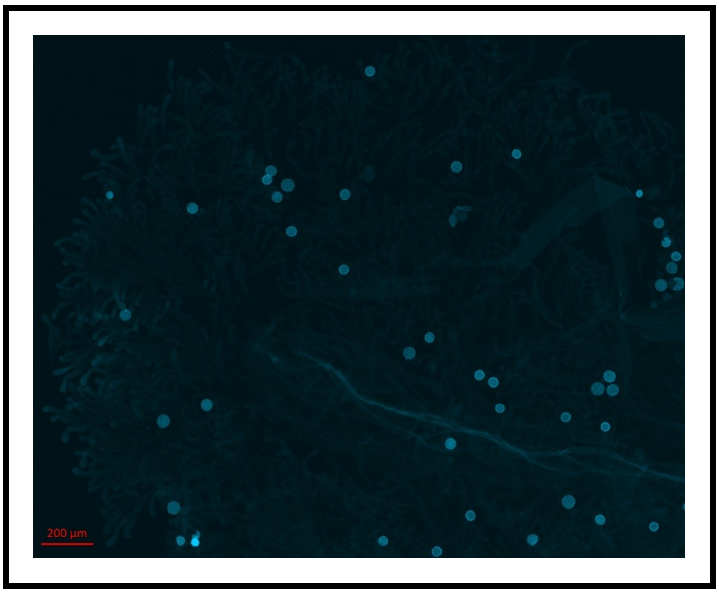


Figure SB1: Picture from the top of a stigma lobe with its papillae (Axio Imager 2 x50). Light blue circles are *Silene dioica*'s pollen grains.

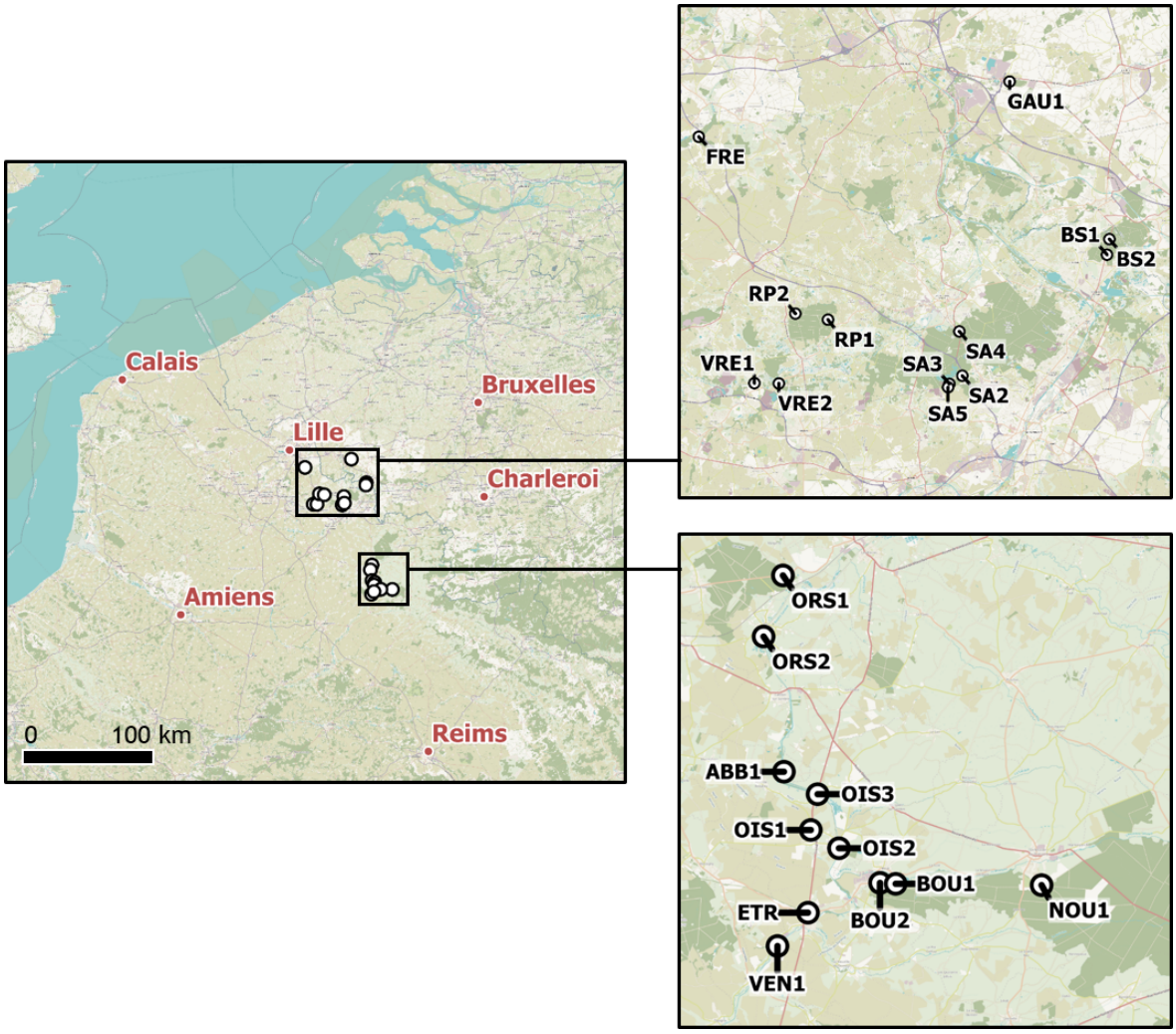


Figure SB2: Location of the 23 populations (white dots) of *Silene dioica* sampled in northern France and Belgium during spring 2018 and 2019. Map realized with QGIS (Version 3.16), with maps from OpenStreetMap (https://www.openstreetmap.org).

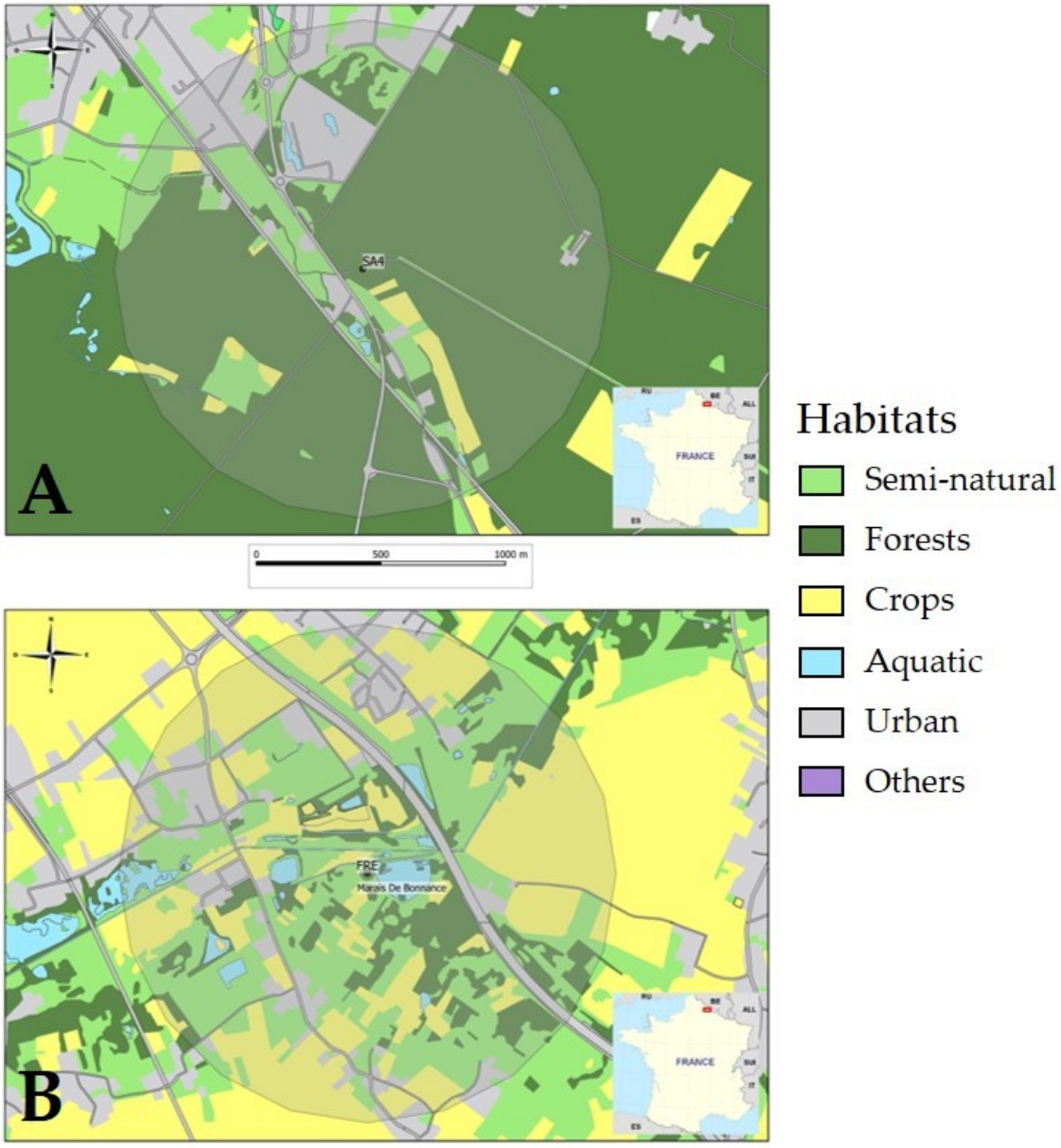


Figure SB3: Habitat characterization in a one-kilometer radius around two *Silene dioica* populations, SA4 (A) and FRE (B). Map realized by P. Tendron with QGIS (Version 3.16), with ARCH mapping data project (Table SB1)

Discussion

Sommaire

1. Interprétations globales des résultats 207
1.1 Sous la perspective des femelles 207
1.1.1 Des traits floraux sous sélection de fécondité 207
1.1.2 Un avantage via la diversité des partenaires sexuels ? 209
1.1.3 Un effet supposé non-linéaire du nombre de fleurs dans l'accès à la reproduction 210
1.2 Sous la perspective des mâles 210
1.2.1 De nombreux effets des traits floraux en interaction avec les pollinisateurs 210
1.2.2 Un effet marqué de la phénologie pour l'accès aux femelles . 211
1.2.3 Un support mitigé à l'hypothèse de la fonction mâle 211
2. Sélection sexe-spécifique : un alignement avec le dimorphisme sexuel ? 212
3. Un retour sur les estimateurs du *mating success* 215

« J'aime bien discuter avec quelqu'un qui est d'accord, ça fait avancer la discussion. »
Le Râtelier - Brèves de Comptoir (J-M. Gourio)

L'attendu classique théorique, au cœur du travail de cette thèse, est que les femelles devraient être limitées dans leur succès reproducteur par leur accès aux ressources nécessaires à la production des ovules et à la maturation des graines, en absence de limitation pollinique (Burd, 1994). Au contraire, les mâles devraient essentiellement être limités dans leur succès reproducteur par l'accès aux gamètes du sexe opposé, ce qui passe dans un premier temps par l'accès aux partenaires sexuels (Moore and Pannell, 2011). Nous essaierons durant cette discussion de confronter la théorie à nos résultats expérimentaux (Tableau 1), et nous reviendrons sur les implications de l'estimation du *mating success* dans les études de la sélection sexuelle chez les plantes.

1. Interprétations globales des résultats

1.1 Sous la perspective des femelles

1.1.1 Des traits floraux sous sélection de fécondité

Le résultat principal concernant les femelles, souligné par les trois premiers manuscrits, est que les traits floraux femelles sous sélection sont majoritairement, si ce n'est exclusivement, ceux qui sont liés à la fécondité, à savoir le nombre de fleurs et le nombre de gamètes par fleur. Le produit de ces deux traits donne en effet une estimation directe du nombre d'ovules produits par femelle. Cette sélection forte sur les traits floraux liés à la fécondité chez les femelles ou par la fonction femelle a déjà été reportée dans de nombreuses études (p. ex. Sandring and Ågren, 2009; Delph and Herlihy, 2012; Chen et al., 2017). Dans toutes nos expérimentations, les supplémentations polliniques nous ont permis de révéler une absence de limitation pollinique. Ce résultat signifie que les femelles pollinisées par les insectes, quel que soit leur phénotype pour les traits floraux potentiellement impliqués dans leur attraction (p. ex. largeur de corolle, volume de nectar), recevaient toutes une quantité de pollen suffisante pour leur permettre de produire autant de graines que les femelles supplémentées. A l'exception du nombre de fleurs, qui a un statut particulier de par son potentiel double rôle (fécondité et attraction), aucun autre trait a priori lié à l'attraction des pollinisateurs n'était sous sélection chez les femelles. Par ailleurs, le fait qu'il n'y ait pas de différence de sélection sur le nombre de fleurs entres les femelles pollinisées naturellement et les femelles supplémentées suggère que ce trait est bien majoritairement sous sélection de fécondité (manuscrit A). De plus, le manuscrit C nous montre que les femelles atteignent un succès reproducteur maximal peu importe la communauté de pollinisateurs impliquée (diurne ou nocturne). L'attraction des insectes ne semble alors pas être une limite pour le succès reproducteur femelles, même si on suspecte que ce patron pourrait varier *in natura* (manuscrit D), et qu'il a été montré que la limitation pollinique était très fréquente dans d'autres systèmes (Burd, 1994; Ashman and Morgan, 2004; Knight et al., 2005).

Tableau 1: Bilan des résultats majeurs de la thèse.

Attendus théoriques	Résultats empiriques majeurs
Manuscrit A: Natural and sexual selection in an insect-pollinated plant	
La pente du gradient de Bateman est plus forte pour les mâles que pour les femelles.	**Vérifié :** La pente est plus forte chez les mâles, et ce résultat reste vrai quand on corrige pour les traits liés à la fertilité (nombre de fleurs et de gamètes, c-à-d gradient de Bateman partiel) comme covariable.
Les traits floraux femelles sont majoritairement sous sélection de fécondité.	**Vérifié :** En accord avec l'observation d'une absence de limitation pollinique dans notre population expérimentale, les seuls traits femelles sous sélection naturelle sont ceux qui ont un rapport direct avec la fertilité (nombre de fleurs et de gamètes).
Plus de sélection sexuelle sur les traits floraux mâles que femelles.	**Partiellement vérifié :** Sélection sexuelle chez les mâles sur un trait non impliqué dans l'attraction des pollinisateurs, la durée de floraison, et marginalement sur la largeur de corolle. Le nombre de fleurs a un effet plus marqué sur le nombre de partenaires chez les femelles que chez les mâles. Le lien entre diversité de partenaires et succès reproducteur femelle reste à clarifier.
Manuscrit B: On the function of flower number: disentangling fertility from pollinator-mediated sexual and natural selection	
Une augmentation artificielle du nombre de fleurs augmente davantage le succès reproducteur des mâles par rapport aux femelles par le biais de l'attraction des pollinisateurs ('male function' hypothesis).	**Partiellement vérifié :** Si l'adjonction de fleurs artificielles n'a pas d'effet sur le succès reproducteur mâle et femelle, ce traitement améliore le bénéfice de porter beaucoup de vraies fleurs chez les mâles uniquement (effet de l'interaction traitement x nombre de vraies fleurs.
Les traits floraux femelles sont majoritairement sous sélection de fécondité.	**Vérifié :** En accord avec l'observation d'une absence de limitation pollinique dans notre pop expérimentale, les seuls traits femelles sous sélection naturelle sont ceux qui ont un rapport direct avec la fertilité (nombre de fleurs et de gamètes).
Le nombre de vraies fleurs devrait être associé positivement au *mating success*, et cet effet devrait être plus fort chez les mâles et chez les individus bénéficiant de l'adjonction de fleurs artificielles.	**Vérifié :** Sélection sexuelle sur le nombre de fleurs chez les deux sexes **Inattendu :** Si l'adjonction de fleurs artificielles n'a pas d'effet sur le *mating success* mâle et femelle, ce traitement diminue l'intensité de relation entre nombre de vraies fleurs et diversité des partenaires chez les femelles uniquement (effet de l'interaction traitement x nombre de vraies fleurs), un effet potentiellement médié par le comportement des pollinisateurs.
Manuscrit C: Exploring the effects of scent emission and exposition to diurnal versus nocturnal pollinators on selection patterns on floral traits	
Une augmentation artificielle du niveau de PAA émis augmente plus le succès reproducteur des individus pollinisés la nuit que ceux pollinisés le jour. Cet effet est plus fort pour les mâles que pour les femelles.	**Non vérifié :** Pas d'effet clair du traitement sur le succès reproducteur (effet principal non significatif).
La sélection sur les traits floraux diffère selon les pollinisateurs diurnes ou nocturnes.	**Vérifié pour les mâles :** Sélection plus forte sur la largeur de corolle par les pollinisateurs de nuit, même patron marginal sur le nombre de fleurs.
Le niveau de PAA émis interagit avec la sélection sur les traits floraux.	**Vérifié pour les mâles :** Exacerbation artificielle de l'émission de PAA affecte les patrons de sélection chez les mâles : (i) sélection plus forte sur la hauteur du calice (la nuit), (ii) sélection plus forte sur le nombre de fleurs (le jour), (iii) sélection moins forte sur le nombre de gamètes (le jour) et (iv) sélection plus forte sur la taille de corolle (effet marginal). **Vérifié sur un seul trait pour les femelles :** L'augmentation artificielle de PAA augmente la sélection sur la taille de calice par les pollinisateurs nocturnes.
Les traits floraux femelles sont majoritairement sous sélection de fécondité.	**Vérifié :** En accord avec l'observation d'une absence de limitation pollinique dans notre pop expérimentale, les seuls traits femelles sous sélection naturelle sont ceux qui ont un rapport direct avec la fertilité (nombre de fleurs et de gamètes).
Manuscrit D: Determinants of pollen load variation in natural populations of a dioecious insect-pollinated species	
A l'échelle de la population : un sexe-ratio biaisé mâle et une plus forte densité augmente la charge pollinique moyenne sur le stigmate des femelles.	**Partiellement vérifié :** Les populations avec un sexe-ratio biaisé mâle ont une charge pollinique moyenne plus élevée.
A l'échelle individuelle : un effet positif des traits floraux potentiellement impliqués dans l'attraction des pollinisateurs sur la charge pollinique, d'autant plus vrai qu'il y a beaucoup de partenaires sexuels dans le voisinage.	**Effet variable en fonction du trait considéré :** La taille de corolle augmente la charge pollinique par fleur, tandis que le nombre de fleurs diminue la charge pollinique par fleur. Un sexe-ratio local biaisé mâle et une forte densité diminue la charge pollinique. En revanche, les effets négatifs du sexe-ratio local biaisé mâle et d'une forte densité locale diminuent lorsque ces caractéristiques du voisinage sont associées à des traits floraux plus attractif.

1.1.2 Un avantage via la diversité des partenaires sexuels ?

Un autre résultat majeur est que les femelles semblent bénéficier d'un avantage en termes de succès reproducteur à acquérir plus de partenaires sexuels (manuscrit A). En effet, le gradient de Bateman partiel (c-à-d régression du succès reproducteur sur le nombre de partenaires sexuels génétiques, en contrôlant statistiquement pour les traits impliqués dans la fécondité ; Henshaw et al., 2018) montre une relation positive[1]. Ce résultat pourrait alors indiquer qu'avoir plus de partenaires sexuels permet d'augmenter la probabilité d'obtenir des partenaires sexuels de bonne qualité génétique, dont les grains de pollen auraient une plus forte probabilité de gagner la compétition pollinique, permettant ainsi d'augmenter le taux de mise à graines (Pannell and Labouche, 2013). Si cette hypothèse explicative peut sembler contre-intuitive au vu de l'absence de limitation pollinique mise en évidence à l'aide des pollinisations manuelles, il faut garder en tête que notre méthode de supplémentation, comme dans la plupart des études (Aizen and Harder, 2007; Marshall et al., 2007), impliquait une maximisation du succès reproducteur des femelles en saturant les stigmates en pollen (c-à-d en jouant sur la quantité de pollen, non pas sur la qualité). Ce pollen provenait de deux mâles différents pour chaque fleur supplémentée. Il se pourrait que nous n'ayons alors pas détecté de limitation pollinique parce que le nombre de mâles utilisés pour les supplémentations à l'échelle de la fleur était trop faible : la qualité du pollen était potentiellement en moyenne insuffisante pour donner un taux de mise à graines optimal. Les femelles en pollinisation naturelle auraient alors probablement bénéficié de pollen provenant de plus de mâles différents. En effet, les études montrent que la polyandrie est courante chez les espèces entomophiles, notamment dioïques (Pannell and Labouche, 2013). Dans cette expérimentation, nous avons échantillonné et génotypé environ 1% des graines produites par chacune des femelles, et nous détectons en moyenne 14 partenaires sexuels par femelle (sur les 102 qui étaient disponibles pour la reproduction). Bien que nous n'ayons pas estimé le nombre de partenaires sexuels à l'échelle de la fleur, il semble ainsi fort probable que les femelles pollinisées naturellement aient effectivement reçu du pollen de plusieurs partenaires par fleur (ce qu'il faudrait vérifier en échantillonnant les graines pour génotypage à l'échelle du fruit). Ces femelles pourraient ainsi avoir un avantage par rapport aux femelles supplémentées en termes de qualité de pollen. Nous aurions alors échoué à estimer le volet qualitatif de la limitation pollinique, en ne jouant que sur le paramètre de la quantité de pollen, et il aurait peut-être fallu augmenter la diversité de ce pollen pour réellement maximiser le succès reproducteur (Aizen and Harder, 2007). En d'autres termes, les femelles pollinisées naturellement auraient peut-être bénéficié d'un avantage à la diversité de partenaires sexuels, que les femelles supplémentées n'auraient pas eu. Cependant, dans la littérature, la diversité de partenaires sexuels dans le pollen présent sur le stigmate montre des effets mitigés que ce soit sur le nombre ou la qualité des descendants (Pélabon et al., 2016; Baskin and Baskin, 2019). Il serait alors intéressant de mettre en place une expérimentation où des femelles seraient supplémentées avec un nombre de grains de pollen fixe, excédant leur nombre d'ovules, mais en faisant varier le nombre de mâles dont provient ce pollen, afin de mieux comprendre les effets de la diversité de partenaires sexuels en termes de succès reproducteur femelle chez *Silene dioica*.

[1] Ce patron est vérifié peu importe la méthode d'échantillonnage des descendants pour les génotypages (au pro rata, au nombre fixe sur les descendants femelles, au nombre fixe chez les deux sexes), sur le nombre de graines totales ou sur le taux de mise à graines, en incluant le taux de germination ou non.

1.1.3 Un effet supposé non-linéaire du nombre de fleurs dans l'accès à la reproduction

Enfin, certains de nos résultats suggèrent que la relation entre le nombre de fleurs et l'accès au pollen en termes de quantité par fleur ou diversité est plus complexe qu'une simple relation linéaire positive. En effet, dans le manuscrit B, la sélection sexuelle sur le nombre de fleurs était amoindrie pour les femelles avec un nombre de fleurs exacerbé, ce qui ne peut-être médié que par les pollinisateurs. Une potentielle relation saturante entre le nombre de fleurs et le nombre de partenaires sexuels pourrait alors exister à l'échelle de l'individu. Cela pourrait être expliqué par le fait que chaque pollinisateur peut visiter plusieurs fleurs chez les femelles qui en produisent beaucoup, ce qui réduit le nombre d'ovules encore disponibles lors des futures visites de pollinisateurs. Cette explication semble cohérente avec le pollinisateur principal, *Bombus terrestris*, qui montre un comportement de recherche de nourriture de proche en proche (Kay et al., 1984; Goulson, 1999). Dans le manuscrit D, le nombre de fleurs a un effet négatif sur la charge pollinique à l'échelle de la fleur, bien que cet effet soit amenuisé quand plus de partenaires sexuels sont présents localement. Si l'on joint ces deux résultats, il se pourrait ainsi que produire un plus grand nombre de fleurs montre une limite en termes de bénéfices pour l'accès aux partenaires sexuels et/ou aux gamètes.

1.2 Sous la perspective des mâles

La vaste majorité des études qui se sont intéressées à l'association entre phénotypes floraux et succès reproducteur ont caractérisé ce lien sous le prisme de la fonction femelle uniquement (p. ex aucune étude n'a quantifié les effets des traits floraux en termes de succès reproducteur mâle dans une méta-analyse récente incluant 755 études de Caruso et al., 2019, mais voir les exceptions dans le Tableau 1 de l'introduction). Pourtant, la relation entre les traits floraux et le succès reproducteur est supposée être sexe-dépendante d'après le principe de Bateman (1948), même si l'amplitude de la différence entre fonction sexuelles ou entre sexes devrait dépendre du contexte pollinique (Pannell and Labouche, 2013; Moore and Pannell, 2011).

1.2.1 De nombreux effets des traits floraux en interaction avec les pollinisateurs

Nous nous attendions à avoir une plus forte sélection sur les traits attractifs mâles que sur les traits attractifs femelles chez *Silene dioica*, et cette hypothèse est partiellement validée. En effet, le manuscrit A dévoile une sélection marginalement positive sur la taille de corolle sur l'ensemble de la saison de floraison, et le manuscrit B montre une sélection clairement positive sur un estimateur de la taille de fleur. Il semblerait ainsi que la fenêtre sur laquelle est estimée le succès reproducteur ait un effet sur l'estimation de la sélection : la forte sélection sur la durée de floraison estimée dans le premier manuscrit pourrait ainsi empêcher de détecter la sélection sur les autres traits floraux importants dans l'attractivité des pollinisateurs, et donc dans l'export pollinique. Cet effet serait gommé dans le cadre du manuscrit B, dévoilant ainsi cette sélection sur la taille des fleurs. Par ailleurs, le manuscrit C montre que, chez les mâles, la sélection sur la taille de corolle est positive uniquement lorsqu'elle est médiée par les pollinisateurs de nuit. Les communautés de pollinisateurs semblent donc bien avoir un effet important sur les patrons de sélection détectés sur les traits floraux (Gómez et al., 2008; Caruso et al., 2019). Les communautés de pollinisateurs pouvant varier au cours de la saison de

floraison, cela pourrait également expliquer pourquoi l'on ne retrouve pas la sélection positive sur la largeur de corolle dans le manuscrit A, puisque celui-ci explorait le lien entre trait floraux et succès de pollinisation sur l'ensemble d'une saison de reproduction, moyennant ainsi les effets potentiellement divergents de différentes communautés. Enfin, les deux expérimentations où nous avons manipulé l'attractivité des plantes (manuscrit B et C) montrent des conséquences en termes d'intensité de la sélection sur les traits floraux des mâles, ce qui ne peut être médié que par les pollinisateurs (la quantité de gamètes étant égale par ailleurs). En comparaison avec les patrons observés chez les femelles dans ces même populations expérimentales, l'ensemble de ces résultats semble bien aller dans le sens d'un effet plus important des traits attractifs pour les pollinisateurs sur le succès reproducteur mâle (Moore and Pannell, 2011).

1.2.2 Un effet marqué de la phénologie pour l'accès aux femelles

Dans l'étude portant sur l'ensemble de la saison de floraison (manuscrit A), le trait qui impactait le plus le succès reproducteur des mâles était clairement la durée de floraison, un trait qui ne constitue pas directement un signal attractif pour les pollinisateurs. Il semblerait en effet qu'il y ait un net avantage à fleurir plus tôt et donc plus longtemps, car cela permet de couvrir la floraison d'un plus grand nombre de femelles, et donc d'augmenter l'accès aux gamètes du sexe opposé (comme montré par la sélection sexuelle positive sur la durée de floraison). Une floraison plus précoce des mâles par rapport aux femelles est ainsi souvent reportée (révisé pour les espèces dioïques dans (Forrest, 2014), et une hypothèse avancée est que cela procurait un avantage en termes de compétition intrasexuelle mâle pour l'accès aux pollinisateurs et donc aux femelles. Bien que peu d'études aient mesuré directement la sélection sur la date et/ou la durée de floraison chez les deux sexes (Austen et al., 2017), nos résultats sont consistants avec une sélection plus forte sur la date de floraison estimé chez les mâles pour augmenter l'accès aux partenaires sexuels, déjà reportée chez d'autres espèces (pour une espèce dioïque, Munguia-Rosas et al., 2011; pour une espèce hermaphrodite, Austen and Weis, 2016). Par ailleurs, une autre étude qui s'est attachée à mesurer la sélection sur les traits mâles chez *Mercurialis annua*, une espèce dioïque anémophile, a montré que la taille de pédoncule, qui permet une dispersion du pollen sur de plus grandes distances, était sous sélection (Tonnabel et al., 2019). Le parallèle est ici intéressant entre *Silene dioica*, dont la durée de floraison permet d'augmenter l'accès aux partenaires sexuels de manière temporelle, et cette espèce, dont la tailles des pédoncules permet d'augmenter l'accès aux partenaires sexuels de manière spatiale. Cette différence dans la fonctionnalité des traits sous sélection est vraisemblablement liée au vecteur de la pollinisation qui diffèrent entre ces espèces, mais plus d'études seraient nécessaires pour comprendre les implications de ce vecteur dans la sélection sur les traits.

1.2.3 Un support mitigé à l'hypothèse de la fonction mâle

Enfin, la sélection que nous avons pu estimer sur le nombre de fleurs chez les mâles s'est révélée différente selon les expérimentations que nous avons menées. Pour rappel, nous nous attendions à une sélection positive sur le nombre de fleurs chez les mâles, selon l'hypothèse de la fonction mâle qui stipule que ce trait devrait être sélectionné chez ceux-ci car il permet d'augmenter non seulement la production de gamètes (comme chez les femelles), mais également l'accès aux partenaires sexuels

qui devrait théoriquement être particulièrement limitant chez les mâles (Burd and Callahan, 2000). Cependant, dans le manuscrit A, aucune sélection sur le nombre de fleurs n'a été estimée chez les mâles, qu'il s'agisse du nombre de fleurs journalier ou total. La seconde expérimentation nous permettait ainsi de mieux comprendre la sélection sur le nombre de fleurs, en augmentant artificiellement l'attractivité des individus à quantité de gamètes égale, afin de mesurer et comparer les impacts en termes de succès reproducteur chez les deux sexes. Le manuscrit B montre ainsi une sélection plus forte sur le nombre de fleurs par le biais de l'attraction des pollinisateurs chez les mâles manipulés, dont la fécondité est inchangée mais l'attractivité vis-à-vis des pollinisateurs est augmentée par rapport aux males témoins. De plus, un grand nombre de fleurs permet une plus grande distance de dispersion du pollen, permettant ainsi d'acquérir plus de partenaires sexuels de manière spatiale. Le nombre de fleurs était ainsi sous sélection sexuelle, ce qui n'avait pas été détecté dans la première expérimentation. Enfin, le manuscrit C semble montrer, comme pour la largeur de corolle, que le nombre de fleurs est sous plus forte sélection par les pollinisateurs nocturnes (pour le traitement sans adjonction de PAA). L'ensemble de ces résultats montre un support mitigé pour l'hypothèse de la fonction mâle, qui stipule que le nombre de fleurs devrait être sous plus forte sélection chez les mâles que les femelles (Bell, 1985; Burd and Callahan, 2000). Une méta-analyse sur une dizaine d'études ayant mesuré principalement l'export de pollen retrouvait également ce support mitigé (Ashman and Morgan, 2004), et les études ayant mesuré la sélection sur le nombre de fleurs à la fois par le biais des deux fonctions sexuelles chez des espèces hermaphrodites retrouve souvent une sélection plus forte pour la fonction femelle (Tableau 1 de l'introduction). Ainsi, la notion de geitonogamie[2] est souvent avancée chez les espèces hermaphrodites auto-compatibles pour expliquer l'absence de sélection ou une sélection négative sur le nombre de fleurs par le biais de la fonction mâle est observé (Klinkhamer and de Jong, 1993; Elle and Meagher, 2000; Hodgins and Barrett, 2008; Lau et al., 2008; van Kleunen and Burczyk, 2008). Chez ces espèces, les individus qui produiraient beaucoup de fleurs auraient plusieurs fleurs visitées par un même pollinisateur. Cela favorisait ainsi les transferts de pollen intra-individu, au détriment de l'export de pollen vers d'autres individus (Harder and Barrett, 1995; Rademaker and De Jong, 1998). Ces transferts de pollen favorisés intra-individuellement résulteraient en une plus forte proportion de descendants issus de l'auto-fécondation, qui pourraient potentiellement souffrir de dépression de consanguinité. Chez les espèces dioïques, l'auto-fécondation est bien sûr impossible, mais être trop attractif pourrait également constituer un frein en termes d'export de pollen (Vamosi & Otto, 2002).

2. Sélection sexe-spécifique : un alignement avec le dimorphisme sexuel ?

Sur l'ensemble de nos résultats, on retrouve des différences sur les patrons de sélection entre mâles et femelles : sur une partie ou toute la saison de floraison, concernant les pollinisateurs diurnes ou nocturnes, ou en termes de sélection naturelle ou sexuelle. Nous verrons dans cette partie comment ces patrons de sélection sont en adéquation avec le dimorphisme observé.

[2]Transfert du pollen d'une fleur vers le stigmate d'une autre fleur, ces deux fleurs étant issues d'un même individu.

Chez de nombreuses espèces dioïques zoogames, on trouve un dimorphisme sexuel sur les traits floraux biaisé vers les mâles, notamment sur la taille et le nombre de fleurs (Delph, 1996; Eckhart, 1999; Tableau 2 de l'introduction). Ces observations sont en accord avec ce qui est communément observé chez les animaux, avec les mâles présentant des phénotypes plus voyants, et également avec les attendus de Bateman (Bateman, 1948; Janicke et al., 2016). Ces différences entre sexe sur les traits floraux ne peuvent évoluer que si ceux-ci ont une héritabilité substantielle, ce qui semblent être le cas chez les hermaphrodites (Ashman and Majetic, 2006), et cette héritabilité a également été confirmée sur quelques traits floraux chez les femelles *Silene dioica* (Giles et al., 2006). Par ailleurs, le fait que les QTL (*Quantitative Trait Loci*) impliqués dans les traits floraux dimorphiques semblent s'être accumulés sur les chromosomes sexuels (Baena-Díaz et al., 2019), ont ainsi probablement facilité l'émergence du dimorphisme. Les résultats de cette thèse confirment le dimorphisme sexuel biaisé vers les mâles chez *Silene dioica* sur un très grand nombre de traits floraux, à l'exception du volume de nectar (manuscrit A). Pour le nombre de fleurs et la largeur de corolle, ce dimorphisme avec les mâles plus voyants est également confirmé dans une très grande majorité de populations naturelles (manuscrit A).

Néanmoins, les patrons de sélection estimés dans nos expérimentations ne sont pas vraiment en adéquation avec le dimorphisme observé pour les traits floraux : la plupart des traits n'étaient pas sous sélection chez aucun des deux sexes, et la sélection sur le nombre de fleurs est plus forte chez les femelles alors qu'elles produisent moins de fleurs. Seule la sélection estimée sur la largeur de corolle, plus forte chez les mâles, est en accord avec le fait que les mâles possèdent de plus larges corolles. Deux hypothèses *a minima* pourraient expliquer pourquoi ces pressions de sélection sur les traits floraux sont différentes du dimorphisme sexuel. La première serait que le dimorphisme actuel observé résulte simplement d'une sélection passée, qui n'a plus lieu actuellement (c-à-d populations à l'équilibre évolutif). Une seconde hypothèse serait qu'il existe un compromis entre allocation des ressources à la reproduction versus survie ou entre reproduction actuelle versus reproduction future, qui diffère entre les sexes. Cela pourrait expliquer pourquoi les femelles produisent moins de fleurs que les mâles, malgré des pressions de sélection plus forte. Si ce compromis est plus fort pour les femelles, cela pourrait représenter un coût à une production excessive de fleurs : chez les femelles qui produisent un nombre élevé de fleurs une année donnée, le compromis réduirait les chances de survie jusqu'à la prochaine saison de floraison, ou entrainerait une production réduite de fleurs à la prochaine saison fleurs (Sletvold and Ågren, 2015). Ainsi, une autre étude s'est intéressée à mesurer les composantes de sélection à l'aide de lignées artificiellement sélectionnées chez les deux sexes de l'espèce sœur *Silene latifolia*, et les auteurs reportent un effet négatif du nombre de fleurs sur la survie chez les femelles (Delph and Herlihy, 2012) ; le même patron pourrait s'appliquer chez *Silene dioica*. Une preuve indirecte qui pourrait aller dans ce sens est que le nombre de fleurs des femelles n'est pas répétable entre saisons de floraison chez *S. dioica*, contrairement aux mâles (Moquet et al., 2020). Par ailleurs, si les autres traits floraux sont répétables entre saisons de floraison, et que les avantages sélectifs de ces traits floraux sont faibles au sein d'une saison, nous aurions pu échouer à estimer la sélection sur ces traits par manque de puissance. Ici, on atteint l'une des limites de nos études : seulement tout ou une partie d'une seule saison de floraison a été suivie, alors que *Silene dioica* est décrit comme une espèce pérenne (Baker, 1947; Jalas and Suhominen, 1986). Bien qu'il s'agisse d'une

limite classique des études sur les espèces pérennes (voir Tableau 1 de l'introduction), les patrons de sélection mesurés dans nos études pourraient être incomplets en termes d'interprétations évolutives. Il serait ainsi intéressant de suivre plusieurs saisons de floraison pour estimer le succès de reproducteur à vie, afin de caractériser dans leur ensemble les différentes composantes de sélection, à savoir sélection de viabilité, de fécondité et sélection sexuelle, ainsi que les conflits pouvant exister entre celles-ci.

L'étude en populations naturelles a également montré que le dimorphisme pouvait varier entre populations, bien que des mesures en jardin commun soit nécessaires pour confirmer ce résultat (manuscrit D). Cette variation pourrait éventuellement être liée au contexte de pollinisation. Aucune de nos expérimentations ne montraient de limitation pollinique (du moins, en jouant sur la quantité de pollen et non sur la diversité), et ce avec des populations expérimentales avec un sexe-ratio équilibré. Cependant, l'exploration de la charge pollinique moyenne en populations naturelles (manuscrit D) semble pointer vers une importante variabilité dans la disponibilité en pollen et une possible limitation pollinique dans certaines populations, notamment celles avec un sexe-ratio biaisé vers les femelles. Il serait alors intéressant d'étudier l'effet du contexte pollinique en termes de pressions de sélection sexe-spécifique sur les traits floraux, et leur lien avec le dimorphisme observé *in natura*. Il serait notamment attendu que les traits floraux attractifs femelles devraient être sous une sélection positive sur les traits floraux liés à l'accès aux gamètes du sexe opposé en cas de limitation pollinique (Bell, 1985; Ashman and Morgan, 2004). En effet, les études ayant manipulé expérimentalement le contexte pollinique montrent qu'il peut avoir un effet sur les patrons de sélection (Dai and Galloway, 2013; Sletvold and Ågren, 2016; Panique and Caruso, 2020), et ce résultat est également retrouvé *in natura* (Emel et al., 2017).

Cependant, les effets reportés du voisinage en interaction avec les traits floraux sur la charge pollinique soulignent également l'importance du voisinage local pour accéder aux gamètes du sexe opposé. Dans nos expérimentations, la distance moyenne de pollinisation varie entre environ 80cm (manuscrit A) et 2m (manuscrit C, pollinisateurs nocturnes), selon le design de l'expérimentation et la communauté de pollinisateurs. Ces courtes distances de dispersion suggèrent alors une grande importance de la composition du voisinage immédiat sur l'accès aux gamètes. Dans le manuscrit A, la production de graines a été suivie tout au long de la saison de floraison, et chaque semaine les individus étaient randomisés pour limiter les effets du voisinage local sur l'ensemble de la saison. Une analyse par fenêtre hebdomadaire des patrons de sélection permettrait ainsi de mieux comprendre l'effet des partenaires sexuels disponibles à courte distance et de leurs traits floraux sur les patrons de sélection. Par ailleurs, ces petites distances de dispersion du pollen pourraient avoir des conséquences en termes de diversité génétique à l'échelle locale. Une analyse en cours de la diversité allélique neutre dans les populations échantillonnées *in natura* en fonction de la densité devrait permettre de mieux comprendre ces conséquences.

Enfin, malgré les effets possibles de la diversité des pères sur le succès reproducteur femelle (discutés en début d'introduction) et les questions qui découlent de l'estimation du mating succes (discutés ci-après), il semblerait que les mâles soient plus dépendant du nombre de partenaires sexuels pour leur succès reproducteur que les femelles, en accord avec le principe de Bateman (manuscrit A, Bate-

man, 1948). Bien que la sélection estimée directement sur les traits floraux ne soit pas vraiment en adéquation avec le dimorphisme observé, il semblerait bien qu'il y ait plus de potentiel pour que la sélection sexuelle agisse chez les mâles.

3. Un retour sur les estimateurs du *mating success*

Dans nos expérimentations, nous souhaitions comparer la sélection sur les traits floraux entre les mâles et les femelles. Pour cette raison, nous avions opté pour une estimation du mating success en termes de nombre de partenaires sexuels génétiques, qui permet directement une comparaison entre sexes. Ainsi, cet estimateur a permis de mettre en avant une relation positive entre le *mating success* et le succès reproducteur chez les deux sexes, avec une relation plus marquée chez les mâles, montrée grâce au gradient de Bateman partiel (manuscrit A). Bien qu'il soit important de noter que le gradient de Bateman est synonyme de sélection sexuelle uniquement si le lien entre *mating success* et succès reproducteur est causal, utiliser le gradient de Bateman partiel permet d'un peu mieux définir cette relation (Henshaw et al., 2018). Également, pour pallier à la corrélation positive inhérente au *genetic mating success* avec le succès reproducteur, une ré-analyse des résultats du manuscrit A à l'aide de modèles d'équations structurelles (méthode développée dans Henshaw et al., 2018), non présentée dans le cadre de ce manuscrit de thèse, avait supporté une action de la sélection sexuelle sur le nombre de fleurs chez les femelles.

Cependant, l'utilisation du *genetic mating success* chez les plantes à fleurs posent d'autres questions techniques. Les protocoles expérimentaux, tels qu'ils ont été mis en place au départ, étaient basés sur un échantillonnage des graines plus important chez les femelles à fort succès reproducteur (donc, d'après nos résultats sur la sélection positive sur le nombre de fleurs, qui avaient produit beaucoup de fleurs). L'idée sous-jacente était d'obtenir un échantillon de graines relativement représentatif de la production de graines à l'échelle de la population. En effet, si une plante produit beaucoup de fleurs (et, à termes, beaucoup de graines), cela fait d'autant plus d'opportunités de fécondation du point de vue des males. Néanmoins, cette méthode d'échantillonnage des descendants peut alors créer une relation artificielle entre le nombre de fleurs et le *mating success*. Pour pallier ce problème, des méthodes de ré-échantillonnage au sein des graines génotypées ont été explorées (manuscrit A et B), et les résultats restent qualitativement inchangés en ce qui concerne la sélection sexuelle sur les traits floraux femelles, sauf pour le nombre de gamètes sur une courte fenêtre temporelle (supplementary material, manuscrit B). Même si cela suggère que nos conclusions n'ont pas été affectées de façon majeure par ces biais, les réflexions sont encore en cours concernant les analyses et résultats. Par ailleurs, la question de l'échelle (individu versus fleur) à laquelle échantillonner les descendants se pose également chez les plantes, comme les fleurs représentent en quelque sorte des « arènes » dans lesquelles la compétition pollinique a lieu. Une exploration initiée des effets de l'échantillonnage (en termes de nombre de descendants et d'échelle), et du niveau de corrélation de paternité, sur l'estimation de la sélection sexuelle sur les traits floraux et sur le gradient de Bateman, à l'aide de simulations, devrait permettre d'en savoir plus. Il apparait ainsi qu'il existe un champ large de questionnements méthodologiques sur l'estimation du *mating success* chez les plantes à fleurs, qui subsistent probablement du fait que

le *genetic mating success* est peu utilisé dans le cadre de la sélection sexuelle sur les traits floraux.

Mis-à-part ces réticences techniques, qui bénéficieront donc d'une analyse plus en profondeur à l'aide de simulations, l'utilisation du nombre de partenaires sexuels génétiques reste un outil utile. En effet il permet, comme dit précédemment, à la fois une comparaison directe entre les sexes mais également de mieux comprendre les avantages en termes de diversité de partenaires sexuels en fin de chaîne de reproduction, après la compétition spermatique/pollinique. Cependant, cet estimateur du *mating success* n'est pas toujours utilisé en les termes explicites de sélection sexuelle chez les plantes. En effet, de nombreuses études font appel à la diversité génétique des partenaires sexuels, notamment dans le cadre de l'étude des corrélations de paternité et/ou des processus impliqués dans la compétition pollinique, mais ces études ne mentionnent pas toutes les termes « sélection sexuelle » (néanmoins, voir Dorken and Perry, 2017 pour une proposition du niveau de corrélation de paternité en tant qu'estimateur de la monopolisation des partenaires sexuels, dans le cadre de la sélection sexuelle). On peut faire le même constat sur la littérature axée sur la sélection médiée par les pollinisateurs et/ou sur les traits floraux attractifs : les résultats ne sont pas toujours inscrits explicitement dans le cadre de la sélection sexuelle, ou du moins ne précise pas forcément les processus impliqués. Le fait que chaque pan de la littérature utilise son propre cadre conceptuel est loin d'être un problème en soit. L'émergence d'un tel vocable spécifique au domaine de recherche en question tient sûrement du fait qu'un vocabulaire étoffé et précis est nécessaire pour que chaque acteur du domaine de recherche en question puisse comprendre les tenants et aboutissants des différents processus sur lesquels les études se focalisent. Néanmoins, et à titre plus personnel, je me suis souvent perdue face à la multitude de termes différents en essayant de faire le bilan des mécanismes impliqués à la fois dans la sélection sexuelle chez les animaux (tous types de fécondation confondus) et les plantes. Cette difficulté est toutefois inhérente à toute réflexion où l'on essaye de faire « rentrer dans des petites cases » des processus continus.

Au-delà de ces difficultés sémantiques, je me suis également heurtée au concept du *mating success* chez les plantes. Dans les études sur la sélection sexuelle chez les plantes, la quantité de gamètes (reçue ou exportée) est ainsi très souvent utilisé comme estimateur du *mating success* (Ashman and Morgan, 2004; Delph and Ashman, 2006), et il semble difficile de proposer d'autres estimateurs (sans pour autant rejeter celui-ci). Cependant, ce proxy comporte également des limites, puisqu'il ne permet pas d'estimer l'effet de la diversité de partenaires sexuels dans l'acquisition des gamètes du sexe opposé. Par ailleurs, du point de vue des mâles, le pollen exporté peut être perdu de multiples manières complexes au cours des visites par les pollinisateurs (Minnaar et al., 2019), tandis que du point de vue femelle la charge pollinique constitue bien une mesure directe et précise de l'accès au pollen, ce qui créer une asymétrie de l'estimateur entre les mâles et les femelles. Une fois de plus, ces limites n'impliquent pas un rejet de la quantité de gamètes (reçue ou exportée) en tant qu'estimateur du *mating success*. Finalement, je crois qu'il n'y a probablement pas de bonne manière unique de mesurer le *mating success*, et ce peu importe l'organisme chez lequel on souhaite étudier la sélection sexuelle : d'où le titre somme toute très vague « d'accès à la reproduction », qui pourrait finalement être la traduction du *mating success* au sens large. L'estimateur choisi permet ainsi de mieux comprendre

les processus impliqués en amont dans la chaine de reproduction (Figure 11 de l'introduction), sans pouvoir conclure sur ce qu'il se passe ensuite s'il s'agit d'un estimateur à l'échelle de l'individu ou des gamètes (compétition spermatique ou pollinique), ou en se heurtant à des biais méthodologiques s'il s'agit du nombre de partenaires sexuels génétiques. Ainsi, il serait probablement plus efficace (et ce travail de thèse ne fait pas exception) de préciser explicitement les implications de la manière dont est estimé le *mating success*, grâce auquel on mesure la sélection sexuelle. Cette justification des processus impliqués aiderait probablement à lever les zones grises développées dans (Alonzo and Servedio, 2019), notamment chez les plantes, où les ambiguïtés (entre sélection de fécondité et sélection sexuelle) semblent particulièrement importantes, les fleurs étant de manière évidente le siège de ces deux types de sélection.

Il serait finalement intéressant de mieux comprendre l'effet qu'ont les différentes estimations du *mating success* à différents stades de la chaîne de reproduction (individu, gamètes et zygote) sur la sélection sur les traits floraux. Par exemple, une expérimentation à la manière de Gauthey et al. (2017), où les auteurs ont combiné *copulatory mating success* et *genetic mating success*, appliquée aux plantes zoogames, pourrait permettre de mieux comprendre les processus impliqués dans la sélection sexuelle selon l'estimateur du *mating success* utilisé. En mesurant tous les estimateurs du *mating success* à différents niveaux de la chaîne de reproduction (individu, gamètes, zygote), cela permettrait de discriminer les effets en termes de patrons de sélection en fonction des processus impliqués (pré/post-pollinisation ou pré/post-compétition pollinique). Une autre alternative serait d'utiliser les techniques nouvellement développées qui permettent d'avoir un suivi des grains de pollen, résolvant ainsi le problème de l'imprécision dans l'export de pollen en tant qu'estimateur du *mating success* (Hasegawa et al., 2015; Minnaar and Anderson, 2019). En effet, on pourrait ainsi estimer où le pollen a été exporté, et donc quantifier, au-delà de la quantité de pollen produit, à quel point ce pollen donne accès à des partenaires sexuels différents. Cela pourrait permettre d'accéder aux avantages à la fois à accéder à plus de gamètes (quantité) mais également à plus de partenaires sexuels différents (qualité). Ces nouvelles perspectives promettent des études riches en nouvelles connaissances sur la manière dont fonctionne l'accès à la reproduction chez les plante, et de manière plus générale sur l'impact de l'estimateur du *mating success* utilisé sur les patrons de sélection sexuelle observés.

References

Aizen, M. A. and Harder, L. D. (2007). Expanding the limits of the pollen-limitation concept: effects of pollen quantity and quality. *Ecology*, 88:271–281.

Alonzo, S. H. and Servedio, M. R. (2019). Grey zones of sexual selection: why is finding a modern definition so hard? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286:20191325.

Ashman, T.-L. and Majetic, C. J. (2006). Genetic constraints on floral evolution: a review and evaluation of patterns. *Heredity*, 96:343–352.

Ashman, T.-L. and Morgan, M. T. (2004). Explaining phenotypic selection on plant attractive characters: male function, gender balance or ecological context? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271:553–559.

Austen, E. J., Rowe, L., Stinchcombe, J. R., and Forrest, J. R. K. (2017). Explaining the apparent paradox of persistent selection for early flowering. *New Phytologist*, 215:929–934.

Austen, E. J. and Weis, A. E. (2016). The causes of selection on flowering time through male fitness in a hermaphroditic annual plant. *Evolution*, 70:111–125.

Baena-Díaz, F., Zemp, N., and Widmer, A. (2019). Insights into the genetic architecture of sexual dimorphism from an interspecific cross between two diverging *Silene* (Caryophyllaceae) species. *Molecular Ecology*, 28:5052–5067.

Baker, H. G. (1947). *Melandrium dioicum* (L. emend) Coss. & Germ. *Journal of Ecology*, 35:283–292.

Baskin, J. M. and Baskin, C. C. (2019). How much influence does the paternal parent have on seed germination? *Seed Science Research*, 29:1–11.

Bateman, A. J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2:349–368.

Bell, G. (1985). On the function of flowers. *Proceedings of the Royal Society of London*, 224:223–265.

Burd, M. (1994). Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. *The Botanical Review*, 60:83–139.

Burd, M. and Callahan, H. S. (2000). What does the male function hypothesis claim? *Journal of Evolutionary Biology*, 13:735–742.

Caruso, C. M., Eisen, K. E., Martin, R. A., and Sletvold, N. (2019). A meta-analysis of the agents of selection on floral traits. *Evolution*, 73:4–14.

Chen, L., Zhang, B., and Li, Q. (2017). Pollinator-mediated selection on flowering phenology and floral display in a distylous herb *Primula alpicola*. *Scientific Reports*, 7:13157.

Dai, C. and Galloway, L. F. (2013). Sexual selection in a hermaphroditic plant through female reproductive success. *Journal of Evolutionary Biology*, 26:2622–2632.

Delph, L. F. (1996). Flower size dimorphism in plants with unisexual flowers. In *Floral biology*. Springer, Boston.

Delph, L. F. and Ashman, T.-L. (2006). Trait selection in flowering plants: how does sexual selection contribute? *Integrative and Comparative Biology*, 46:465–472.

Delph, L. F. and Herlihy, C. R. (2012). Sexual, fecundity, and viability selection on flower size and number in a sexually dimorphic plant. *Evolution*, 66:1154–1166.

Dorken, M. E. and Perry, L. E. (2017). Correlated paternity measures mate monopolization and scales with the magnitude of sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 30:377–387.

Eckhart, V. M. (1999). Sexual dimorphism in flowers and inflorescences. In *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin.

Elle, E. and Meagher, T. R. (2000). Sex allocation and reproductive success in the andromonoecious perennial *Solanum carolinense* (Solanaceae). II. Paternity and functional gender. *The American Naturalist*, 156:622–636.

Emel, S. L., Franks, S. J., and Spigler, R. B. (2017). Phenotypic selection varies with pollination intensity across populations of *Sabatia angularis*. *New Phytologist*, 215:813–824.

Forrest, J. R. K. (2014). Plant size, sexual selection, and the evolution of protandry in dioecious plants. *The*

American Naturalist, 184:338–351.

Gauthey, Z., Tentelier, C., Lepais, O., Elosegi, A., Royer, L., Glise, S., and Labonne, J. (2017). With our powers combined: integrating behavioral and genetic data to estimate mating success and sexual selection. *Rethinking Ecology*, 2:1–26.

Giles, B. E., Pettersson, T. M., Carlsson-Granér, U., and Ingvarsson, P. K. (2006). Natural selection on floral traits of female *Silene dioica* by a sexually transmitted disease. *New Phytologist*, 169:729–739.

Gómez, J. M., Bosch, J., Perfectti, F., Fernández, J., Abdelaziz, M., and Camacho, J. (2008). Spatial variation in selection on corolla shape in a generalist plant is promoted by the preference patterns of its local pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275:2241–2249.

Goulson, D. (1999). Foraging strategies of insects for gathering nectar and pollen, and implications for plant ecology and evolution. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 2:185–209.

Harder, L. D. and Barrett, S. C. H. (1995). Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. *Nature*, 373:512–514.

Hasegawa, Y., Suyama, Y., and Seiwa, K. (2015). Variation in pollen-donor composition among pollinators in an entomophilous tree species, *Castanea crenata*, revealed by single-pollen genotyping. *PLOS ONE*, 10:e0120393.

Henshaw, J. M., Jennions, M. D., and Kruuk, L. E. B. (2018). How to quantify (the response to) sexual selection on traits. *Evolution*, 72:1904–1917.

Hodgins, K. A. and Barrett, S. C. H. (2008). Natural selection on floral traits through male and female function in wild populations of the heterostylous daffodil *Narcissus triandrus*. *Evolution*, 62:1751–1763.

Jalas, J. and Suhominen, J. (1986). *Atlas florae europaeae: distribution of vascular plants in Europe. 7. Caryophyllaceae (Silenoideae)*. Cambridge University Press, Cambridge.

Janicke, T., Häderer, I. K., Lajeunesse, M. J., and Anthes, N. (2016). Darwinian sex roles confirmed across the animal kingdom. *Science Advances*, 2:e1500983.

Kay, Q. O. N., Lack, A. J., Bamber, F. C., and Davies, C. R. (1984). Differences between sexes in floral morphology, nectar production and insect visits in a dioecious species, *Silene dioica*. *New Phytologist*, 98:515–529.

Klinkhamer, P. G. L. and de Jong, T. J. (1993). Attractiveness to Pollinators: A Plant's Dilemma. *Oikos*, 66:180.

Knight, T. M., Steets, J. A., Vamosi, J. C., Mazer, S. J., Burd, M., Campbell, D. R., Dudash, M. R., Johnston, M. O., Mitchell, R. J., and Ashman, T.-L. (2005). Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36:467–497.

Lau, J. A., Miller, R. E., and Rausher, M. D. (2008). Selection through male function favors smaller floral display size in the common morning glory *Ipomoea purpurea* (Convolvulaceae). *The American Naturalist*, 172:63–74.

Marshall, D. L., Shaner, M. G. M., and Oliva, J.-P. (2007). Effects of pollen load size on seed paternity in wild radish: the roles of pollen competition and mate choice. *Evolution*, 61:1925–1937.

Minnaar, C. and Anderson, B. (2019). Using quantum dots as pollen labels to track the fates of individual pollen grains. *Methods in Ecology and Evolution*, 10:604–614.

Minnaar, C., Anderson, B., de Jager, M. L., and Karron, J. D. (2019). Plant–pollinator interactions along the pathway to paternity. *Annals of Botany*, 123:225–245.

Moore, J. C. and Pannell, J. R. (2011). Sexual selection in plants. *Current Biology*, 21:R176–R182.

Moquet, L., Lateur, L., Jacquemart, A.-L., De Cauwer, I., and Düfay, M. (2020). Temporal dynamics of sexual dimorphism in a dioecious species. *Annals of Botany*, 126:471–480.

Munguia-Rosas, M. A., Ollerton, J., and Parra-Tabla, V. (2011). Phenotypic selection on flowering phenology and size in two dioecious plant species with different pollen vectors. *Plant Species Biology*, 26:205–212.

Panique, H. and Caruso, C. M. (2020). Simulated pollinator declines intensify selection on floral traits that facilitate selfing and outcrossing in *Impatiens capensis*. *American Journal of Botany*, 107:148–154.

Pannell, J. R. and Labouche, A.-M. (2013). The incidence and selection of multiple mating in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368:20120051.

Pélabon, C., Hennet, L., Bolstad, G. H., Albertsen, E., Opedal, Ø. H., Ekrem, R. K., and Armbruster, W. S. (2016). Does stronger pollen competition improve offspring fitness when pollen load does not vary? *American Journal of Botany*, 103:522–531.

Rademaker, M. C. J. and De Jong, T. J. (1998). Effects of flower number on estimated pollen transfer in natural populations of three hermaphroditic species: an experiment with fluorescent dye. *Journal of Evolutionary Biology*, 11:623–641.

Sandring, S. and Ågren, J. (2009). Pollinator-mediated selection on floral display and flowering time in the perennial herb *Arabidopsis lyrata*. *Evolution*, 63:1292–1300.

Sletvold, N. and Ågren, J. (2015). Nonlinear costs of reproduction in a long-lived plant. *Journal of Ecology*, 103:1205–1213.

Sletvold, N. and Ågren, J. (2016). Experimental reduction in interaction intensity strongly affects biotic selection. *Ecology*, 97:3091–3098.

Tonnabel, J., David, P., Klein, E. K., and Pannell, J. R. (2019). Sex-specific selection on plant architecture through "budget" and "direct" effects in experimental populations of the wind-pollinated herb, *Mercurialis annua*. *Evolution*, 73:897–912.

van Kleunen, M. and Burczyk, J. (2008). Selection on floral traits through male fertility in a natural plant population. *Evolutionary Ecology*, 22:39–54.

Remerciements

Tout d'abord, un très grand merci à Joëlle Ronfort et Patrice David d'avoir accepté d'être rapporteurs ce travail de thèse. Je remercie tout aussi chaleureusement les autres membres du jury, Jacqui Shykoff, Sylvie Muratorio et Joël Cuguen pour leur implication dans l'évaluation de cette thèse.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont permis de murrir les réflexions (parfois encore en cours) autour de ce travail de thèse. Merci à Céline Devaux pour son soutien et ses précieux conseils statistiques, merci à Jeanne Tonnabel pour ses recommandations en tant que consoeur de la sélection sexuelle chez les plantes, et merci à Nina Sletvold et Anne-Laure Jacquemart pour leurs avis qui ont permis de guider les expérimentations de cette thèse.

Toutes ces réflexions autour du travail de thèse seraient cependant du vent sans les sacro-saintes données. En ce sens, merci à toutes les personnes grâce auxquelles elles ont pu être capturées à l'état sauvage et mises au chaud dans un disque dur. Merci à toutes les personnes de la plate-forme Bio Mol : tout particulièrement, merci à Cécile pour son support inestimable tout au long des obtentions de génotypes, et merci à Laurence pour sa gentillesse et ses multiples coups de main. Je tiens à remercier également les personnes de la plate-forme serre, pour tout le soin apporté à nos collections et les nombreuses et fastidieuses mise en boîte de plantules. Expréssement merci à Eric, sans lequel je n'aurais probablement jamais pu quitter le labo avec tous ces fruits à récolter puis à décortiquer. Enfin, un énorme merci à toutes les personnes qui m'ont aidée (et supportée) durant leurs stages : merci à Rémy Boisserie, Valentin Mahut, Pauline Drouvin, Nicolas Le Roux, Rémi Borelle et Pauline Tendron.

Je ne serai pas en train d'écrire ces lignes si on ne m'avait pas donné l'opportunité d'effectuer cette thèse. Merci à Sylvain pour tous les autographes. La petite note epistémologique sur la recherche expérimentale n'existera pas ailleurs que dans ma tête, mais je m'évertuerai à continuer d'y songer. Et puis, bien sûr, merci puissance 10 000 à Isabelle et Mathilde. Mathilde, grâce à toi, je crois être un peu moins tétanisée qu'auparavant à l'idée de faire des bêtises. "L'erreur est humaine"; c'est un précepte qui semblerait simple à assimiler. Pourtant, me l'être fait rappeler par tes paroles m'a vraiment aidée par moment à me remettre d'aplomb. Isabelle, merci pour tout : les virées dans la pampa à la recherche de nouvelles femelles à reluquer, les pauses clopes, les discussions anthropomorphées sur la reproduction des plantes, les décorticages de fruits-surprises en écoutant Didier Super... C'était un sacré défi que de m'accueillir au labo, sans même que l'on ait pu se rencontrer avant, et de m'accorder ta confiance, merci. Est-ce qu'il sera possible un jour d'achever de creuser le trou du *MS* ? Rien n'est moins certain, mais c'était en tout cas super d'avoir pu attaquer ce gros chantier avec vous !

Pour finir, merci à ma famille pour toute leur compréhension vis-à-vis de ce drôle d'examen qui m'empêchait parfois de rentrer sereinement auprès d'eux. Et, bien évidemment, merci, merci, merci à tous les copains. Les copains du labo, les copains Lillois, les copains Izéens-Livréens (au passage, merci au comité des fêtes de Livré-sur-Changeon pour l'emporte-pièce à papillotes), les copains du Tour de la France, et tous mes, passés ou actuels, incroyables colocataires. Sans vous tous, et sans vouloir faire des lois de patate, je n'arriverais à rien, c'est certain !

« Si tous les bistrots ferment, tant pis, on s'accoudera les uns sur les autres. »

Café Pirouette - Brèves de Comptoir (J-M. Gourio)

Playlist

"ThesisT" sur la vilaine plateforme au logo vert

Donovan - Get Thy Bearings
Perfume Genius - Learning
Viagra Boys - Slow Learner
Fontaines D.C. - Big
Teleman - Fall In Time
Pulp - Mile End
Eels - The Sound Of Fear
Le Villejuif Underground - Post Master Failure
Oleander - Why I'm Here
Bauhaus - Dark Entries
The Dandy Warhols - Get Off
Echo & **the Bunnymen -** It's Alright
The Growlers - Try Hard Fool
Fugazi - I'm So Tired
Bikini Machine - Stop All Jerk
The Offspring - Come Out and Play
Ramones - I Wanna Be Sedated
The Murder City Devils - Rum To Whiskey
Thundamentals - My Favourite Song
Save Ferris - Come On Eileen
LCD Soundsystem - Dance Yrself Clean
Queens of the Stone Age - Go With The Flow
Muph & **Plutonic -** Heaps Good
Senbeï ft Miscellaneous - Stand Up Stand Out
Cee-Roo - Work Song
Sublime - Seed
Cream - World of Pain
Nick Cave & **the Bad Seeds -** Work Song
The Smiths - That Joke Isn't Funny Anymore
Black Lips - Can't Hold On
Naive New Beaters - Break
Blondie - Sunday Girl
Radiohead - Everything In Its Right Place
The Prodigy - Stand Up
Dropkick Murphys - Worker's Song
Aretha Franklin - Think
alt-J - Ms
OK Go - Here It Goes Again
Frank Black - Headache
Tame Impala - Feels Like We Only Go Backwards
Portico Quartet - Endless
Fun Lovin' Criminals - Couldn't Get It Right
The Black Keys - Psychotic Girl
Liquido - Narcotic
The Almight Defenders - Bow Down And Die
IDLES - Anxiety
Tom Rosenthal - Throw The Fear
The Damned - Life Goes On
King Gizzard & **the Lizard Wizard -** Work This Time
pg.lost - Terrain
The Cure - A Forest
Ultimate Spinach - Mind Flowers

Elliott Smith - Needle In The Hay
Pavement - Grounded
The Hives - Won't Be Long
Beach House - Master Of None
Icarus Himself - Digging Holes
The Dø - Keep Your Lips Sealed
Rancid - Time Bomb
Juiceboxxx - The Losers
The Vaselines - Son Of A Gun
Pennywise - Bro Hymn
Supertramp - Take The Long Way Home
The Mouse Outfit ft Truthos Mufasa & **Black Josh -** Sit Back
Audioslave - Doesn't Remind Me
Parquet Courts - Human Performance
Slaves ft Mike D - Consumed Or Be Consumed
Sleaford Mods - Tweet Tweet Tweet
Stupeflip - Strange Traps
Curse Ov Dialect - Renegades
R.E.M - It's The End Of The World As We Know It (And I Feel Fine)
Ceramic Dog - Lies My Body Told Me
Hilltop Hoods - The Nosebleed Section
The Clash - Straight To Hell
Miriam Makeba - Quit It
Sonic Youth - Schizophrenia
The Green Flamingos - The Rush Kicks In
Amon Tobin - At The End Of The Day
The Beatles - I'm Only Sleeping
Broken Bells - Sailing To Nowhere
Karen Dalton - Something On Your Mind
Unknown Mortal Orchestra - So Good At Being In Trouble
Jonwayne ft Zeroh - Afraid Of Us
Fuzz - Let It Live
Blur - Out Of Time
Simple Minds - Alive And Kicking
The Strokes - Two Kinds Of Happiness
Poésie Zéro - Boulot
Simon & **Garfunkel -** Wednesday Morning, 3 A.M
The Chemical Brothers - Asleep From Day
Those Poor Bastards - Give Me Drugs
Frustration - Too Many Questions
The Byrds - Wasn't Born To Follow
Pixies - Gouge Away
Descendants - Hope
Man Man - Head On (Hold On To Your Heart)
John Frusciante - Before The Beginning
Mister Modo & **Ugly Mac Beer ft Jessica Fitoussi -** Not Afraid
The Brian Jonestown Massacre - Straight Up And Down

Accès à la reproduction chez *Silene dioica*, une plante dioïque entomophile

Résumé : L'accès à la reproduction chez les plantes zoogames est conditionné par les pollinisateurs, qui assurent les transferts de pollen entre individus. En ce sens, les traits floraux liés à l'attraction des pollinisateurs et/ou qui optimisent le prélèvement ou le dépôt de pollen par les pollinisateurs devraient être sous sélection sexuelle. Cette composante de la sélection naturelle agit en effet sur les traits qui affectent l'accès aux partenaires sexuels et/ou aux gamètes du sexe opposé. En raison de l'anisogamie, la théorie prédit que le succès reproducteur acquis via la fonction mâle devrait dépendre plus fortement de l'accès aux partenaires que le succès reproducteur acquis via la fonction femelle, résultant en des patrons de sélection différents entre fonctions sexuelles. Cependant, rares sont les études portant sur les plantes (i) qui ont estimé la sélection sur les traits floraux chez les deux sexes ou fonctions sexuelles, ou (ii) qui se sont intéressées explicitement à la sélection sexuelle en termes de diversité de partenaires reproducteurs. Ce travail de thèse vise ainsi principalement à comprendre les patrons de sélection sur les traits floraux chez une espèce dioïque entomophile, *Silene dioica*, à l'aide de diverses méthodes expérimentales. En introduction, les études portant sur la sélection sexuelle chez les animaux sont confrontées à celles portant sur la sélection sur les traits floraux, afin de tenter de définir un cadre conceptuel dans lequel étudier la sélection sexuelle chez les plantes zoogames. Dans le premier chapitre, les approches classiquement utilisées pour étudier la sélection sexuelle chez les animaux sont associées à celles classiquement utilisées pour étudier la sélection médiée par les pollinisateurs, afin d'identifier les traits sous sélection sexe-spécifique. Le second chapitre se focalise sur deux traits floraux probablement importants pour l'attraction des pollinisateurs, le nombre de fleurs et l'émission d'odeur, exacerbés à l'aide de manipulations phénotypiques. Cette méthode permet ainsi de dissocier la sélection de fécondité de la sélection liée à l'attraction des pollinisateurs, deux composantes de la sélection naturelle agissant potentiellement sur les traits floraux. Par ailleurs, les pressions de sélection exercées sur les traits floraux par les pollinisateurs diurnes versus nocturnes sont caractérisées, via une manipulation de l'accès des plantes aux deux cohortes de pollinisateurs. Dans le troisième chapitre, les effets du contexte démographique et écologique en termes d'accès au pollen sont caractérisés *in natura*, par le biais de la charge pollinique. En conclusion, les résultats de ces chapitres sont abordés en synergie afin de comprendre comment les patrons de sélection sexe-spécifiques sur les traits floraux s'accordent avec la théorie et comment ils dépendent du contexte spatio-temporel. Il ressort de l'ensemble de ces résultats que les traits floraux femelles sont principalement sous sélection de fécondité, tandis que la sélection sur les traits floraux mâles semble être davantage liée au moins partiellement à l'attraction des pollinisateurs. Par ailleurs, les mâles sont plus limités dans leur succès reproducteur par la diversité des partenaires reproducteurs, comparés aux femelles, ce qui semble se manifester par une forte sélection sexuelle sur la phénologie de floraison pour augmenter l'accès aux femelles. En perspective, les implications de l'approche utilisée dans la caractérisation des patrons de sélection sexuelle sont discutées.

Mot-clés : sélection sexuelle – pollinisateurs – traits floraux – *mating success* – dimorphisme sexuel

Accessing partners in a dioecious insect-pollinated species: the case of *Silene dioica*

Summary: In insect-pollinated plant species, mating success is conditioned by pollinators, which ensure pollen transfer. Floral traits that play a role in pollinator attraction and/or traits that optimize pollen export or deposition by pollinators are expected to be under sexual selection. Indeed, this component of natural selection acts on traits that impact mate and/or gamete acquisition. Because of anisogamy, the theory predicts that reproductive success acquired via the male function should depend more strongly on access to partners than reproductive success acquired via the female function, resulting in different selection patterns between sexual functions. However, in angiosperms, few studies (i) have estimated selection on floral traits in both sexes or in both sexual functions, and (ii) have explicitly addressed sexual selection in terms of sexual partner's diversity. The aim of this thesis is to understand selection patterns on floral traits in a dioecious insect-pollinated species, *Silene dioica*, using various experimental methods. In the introduction section, studies on sexual selection in animals are confronted with those focusing on selection on floral traits, in order to define a conceptual framework for sexual selection studies on insect-pollinated plant species. In the first chapter, approaches that are classically used when studying sexual selection in animals are combined with those classically used when characterizing pollinator-mediated selection on floral traits, in order to identify traits undergoing sexual selection. The second chapter focuses on two floral traits implicated in pollinator attraction, flower number and odor emission. Both traits were independently exacerbated using phenotypic manipulations. This method allowed us to dissociate the effect of fertility selection from pollinator-mediated selection, as both can act jointly on floral traits. Furthermore, selection pressures exerted on floral traits by diurnal versus nocturnal pollinators are characterized using an exclusion treatment. In the third chapter, the effects of demographic and ecological context in terms of pollen availability for females are characterized *in natura*, by estimating pollen load. In conclusion, results of these chapters are discussed all together in order to understand how sexual selection patterns on floral traits agree with the theory and how it depends on spatio-temporal variations. Our results indicate that female floral traits are mainly under fecundity selection, while selection on male floral traits seems to be further associated to pollinator attraction. Moreover, males are more limited in their reproductive success by sexual partner's diversity, compared to females. This is emphasized by strong sexual selection on flowering phenology to increase access to females. In perspective, the methodological implications of estimating sexual selection patterns are discussed.

Keywords: sexual selection – pollinators – floral traits – mating success - sexual dimorphism