



HAL
open science

Retour vers le passé : adaptation rapide du système de reproduction chez les plantes à fleurs

Samson Acoca

► **To cite this version:**

Samson Acoca. Retour vers le passé : adaptation rapide du système de reproduction chez les plantes à fleurs. Biologie végétale. Université de Montpellier, 2024. Français. NNT : 2024UMONG009 . tel-04884831

HAL Id: tel-04884831

<https://theses.hal.science/tel-04884831v1>

Submitted on 13 Jan 2025

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie et Écologie évolutives

École doctorale GAIA

Unité de recherche Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive

Retour vers le passé : adaptation rapide du système de reproduction chez les plantes à fleurs

Présentée par Samson Acoca-Pidolle
Le 4 Octobre 2024

Sous la direction de Pierre-Olivier Cheptou

Devant le jury composé de

Ophélie Ronce, Directrice de recherche CNRS, Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier

Emmanuelle Porcher, Professeure, Muséum National d'Histoire Naturelle

John K. Kelly, Professor, University of Kansas

Isabelle de Cauwer, Maîtresse de conférence, Université de Lille

Mathieu Lihoreau, Directeur de recherche CNRS, Centre de Recherches sur la Cognition Animale-CBI Toulouse

Pierre-Olivier Cheptou, Directeur de recherche CNRS, Centre d'Écologie Fonctionnelle Évolutive

Présidente du jury

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ DE
MONTPELLIER



Avant-propos

Bien que ce soit les premiers pour vous, ces quelques mots sont les derniers écrits pour ma thèse. Aussi, j'ai décidé de commencer par un bilan. Bien que complète, cette thèse ne correspond pas à un travail fini mais au travail que j'ai fourni dans le temps qui m'était imparti, c'est-à-dire trois années, plus mes six mois de stage de deuxième année de Master, moins les deux mois et demi précédents la soutenance et la fin de mon contrat d'embauche. Quoi qu'il en soit, même si j'avais eu quatre, six, ou dix ans pour la réaliser, cela ne correspondrait pas à un travail fini tant le sujet est vaste, foisonnant et passionnant, et heureusement. J'espère donc que ce travail vous amènera également beaucoup de questions, beaucoup de réflexions, et seulement quelques réponses.

Cette thèse reflète trois années de travail mais est également le fruit des années de réflexion, d'observation et d'apprentissage qui l'ont précédée. L'enfant qui rêvait d'être joueur de rugby professionnel n'y voit probablement pas un aboutissement mais plutôt une étape, et je ne peux pas lui donner totalement tort. Cependant, c'est indéniablement une étape importante, une étape professionnelle vers, peut-être, un métier nécessitant le « grade de docteur », une étape éthique avec la déclamation du serment d'intégrité scientifique, mais surtout une étape de vie, la fin de la vie d'étudiant et le début d'un nouveau monde où les places de cinéma coûtent un bras.

C'est aussi le moment de se retourner et de remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné, et par moment guidé même, sur le chemin qui menait à cette étape. Ce n'est pas particulièrement quelque chose que j'apprécie faire et encore moins publiquement, aussi les remerciements qui suivent concernent essentiellement les personnes à qui ils sont adressés et ne sauraient être exhaustifs. J'ai bonne confiance pour que les personnes qui ne se retrouvent pas nommément dans ce qui suit, sachent déjà à quel point je les remercie pour tout ce qu'elles m'ont apporté et pour que celles qui sont nommées sachent que ce qu'elles m'ont apporté va bien au-delà de ce qui est écrit ici. Parce que c'est beaucoup trop long et peu intéressant, je vous conseille de passer directement à la suite qui est, je l'espère, bien plus captivante en sautant les deux pages qui suivent, sinon, bon courage.

Tout d'abord merci aux personnes avec qui j'ai travaillé durant cette thèse. Je tiens à te remercier Pierre-Olivier, de m'avoir accepté en stage une année où tu étais déjà bien occupé, d'avoir pris le risque de me mettre sur les rails de ce sujet expérimental malgré l'année que nous venions de passer, et d'avoir accepté de monter le sujet de thèse avec moi en à peine une semaine après avoir passé 8h de trajet ensemble pour aller échantillonner nos pensées (« non, ce n'est toujours pas une pensée, probablement une véronique plutôt »). Merci de m'avoir toujours laissé toute mon autonomie et la liberté de voguer où je le voulais, et d'avoir, pratiquement, toujours valorisé les pistes que j'amenais. J'espère être arrivé au niveau d'émancipation auquel tu essayes d'amener les personnes que tu encadres. Merci pour ces discussions, qui souvent dépassaient largement la science, ces anecdotes, et nos désaccords, il en faut et ils n'ont jamais été un problème. Enfin merci pour ton écoute et ton soutien quand ils étaient nécessaires.

Merci Perrine pour avoir été toujours prête à m'accompagner dans mes idées stupides. « Tiens, et si on suivait 800 plantes pendant près de 8h par jour pendant au moins un mois ? Tiens, et si on disséquait des ovaires et comptait des ovules sous la binoculaire pendant 8h par jour ? » Merci de nous avoir allègrement nourri de gâteaux et autres sucreries. Merci pour ces verres et ces discussions au pied d'une montagne ou ailleurs.

Merci Virginie d'avoir aussi été prête à t'embarquer dans mes âneries, d'avoir accepté d'essayer de dompter mon ordinateur pour saisir les mesures que je te balançais et de nous avoir fait boire de sacrées tisanes.

Merci Louis pour m'avoir accompagné durant mon stage de master, pour les rigolades, les allers-retours à Baillarguet ensemble, les mêmes partagés et les escapades cévenoles.

Merci Pauline, Fabien et Thierry pour avoir toujours été prête et prêts à me donner un coup de main avec les plantes, à les bichonner et à s'échanger quelques blagues. Merci David pour avoir quelques fois partagé l'or que tu as dans les mains pour bricoler avec moi (souvent des vélos). Tout est possible avec toi et c'était un bonheur de pouvoir faire ça avec toi. Merci Marie-Pierre pour m'avoir appris à faire de la génétique moléculaire et pour m'avoir fait la discussion et aidé lorsque tu m'accueillais dans ton bureau pour ces satanés microsattellites.

Merci aux personnes sans qui faire de la recherche au CEFÉ serait impossible, merci Marylène, merci à la gestion et aux infos. Vous êtes toujours là pour donner un coup de main et débloquer la situation quand il y a un pépin, malgré la charge de travail déjà immense, et je vous en remercie sincèrement.

Merci Antoine et Thomas d'avoir bien voulu que je vous encadre lors de vos stages de première année de master en échange de vos bras et de vos réflexions.

Merci aussi aux personnes de l'équipe avec qui je n'ai pas travaillé directement. Merci Virginie pour les discussions toujours extrêmement intéressantes et qui donnent envie d'en avoir plus. Merci Anne d'être toujours prête à nous raconter des histoires ou à discuter karaoké à la cantine. Merci Marine pour ces discussions lors de mon arrivée en thèse qui m'ont permis d'élargir mes pensées et de partager nos déboires de profs. Merci Thibaut d'avoir toujours amené ta bonne humeur et ta capacité à te tromper de destinataires dans tes courriels.

Merci beaucoup Line. Tu as été une rencontre formidable qui m'a mis énormément de baume au cœur durant les quelques mois où tu étais là, même si j'étais toujours très pessimiste selon toi. Merci pour ce goûter dans un jardin dérobé, à y refaire le monde et ce délicieux pain à la châtaigne.

Merci aux gens de l'étage pour les sorties, les moments à la cantine et les parties de coinche post-prendiales ou intempestives. Merci Romain, pour nous rappeler qu'on n'est pas très loin de Marseille quand tu te décides à parler, pour les soirées cartes et bières où la bière prend parfois le pas sur les cartes. Merci Gustave pour ton sens de la narration qui rendrait une banale histoire digne des plus grands polars. Merci Tristan pour toujours raconter des âneries et être motivé pour une coinche, un volley ou parler rugby. Merci Sara pour les viennoiseries, l'accompagnement dans les heures les plus matinales et l'attention que tu portes aux personnes qui t'entourent. Merci Martha pour ce second degré toujours tranchant. Merci Alice pour les rigolades et le crumble aux pommes. Merci Étienne pour ta gentillesse, ton écoute et pour toujours glisser un petit mot sympathique quand on se croise. Merci Johan pour ces deux fois six mois passés avec nous, par intermittence. Même si ça a été court, merci Léo pour les bons moments lors de ces derniers mois de thèse, entraîne-toi bien au volley pour 2028.

Plus largement, merci à toutes les personnes, notamment non-permanentes, que j'ai côtoyées durant ma thèse. Ces apéros fous au bois de Montmaur lors de mon arrivée au CEFÉ qui avaient tendance à finir chez toi Valentin, avec vous Benjamin, Fanny et Marie. Merci pour les discussions toujours agréables, les rencontres et les rigolades toujours sympathiques entre compagnons de galère. Merci Célian, merci Gilles, merci Maurine, merci Wakinyan, merci Martin, merci Killian, merci la bande des mésanges.

Merci Laurine pour les bêtises, les rigolades, les découvertes cinématographiques et des mœurs de tes « bébous », et merci pour m'avoir laissé gagner au Gobbit. Téo, cette année a été bien trop courte, mais merci pour ces heures passées à discuter les fesses tannées par nos selles ou autour d'une bière, hâte de monter ce club des « Causse-tôt de la selle ».

Ana, merci pour tout. Tu es toujours pleine d'enthousiasme et d'attention pour les personnes qui ne sont que de passage au CEFE et cela change tout. Cela fait qu'il « fait bon vivre au CEFE, hein », en plus de la cantine bien entendu. Mais tu ne t'arrêtes pas à ça, tu es toujours prête à rendre service pour relire des papiers, partager tes savoirs quant au mode de fonctionnement de la recherche et aider à construire notre projet pour la suite, et ce alors même que c'est sur des thématiques bien lointaines des tiennes et que tu es déjà totalement à la bourre pour tes propres dates butoirs. J'espère ne pas avoir trop abusé de ton temps et de ta patience. Merci pour être toujours prête à aller te balader pour voir des plantes et des bestioles, même si ça inclut la sempiternelle question : « connaissez-vous iNaturalist ? ». Enfin, merci beaucoup pour toute l'énergie que tu dépenses pour créer et maintenir les liens au sein du département, et même du CEFE, liens qui sinon manqueraient.

Enfin, et je m'arrêterai là pour le CEFE, merci beaucoup aux deux personnes qui ont eu à me supporter le plus souvent. Merci beaucoup Ninon d'avoir passé ces trois années avec moi, au bureau, dont les deux dernières années en face de moi, à supporter mes coups de pied, mes positions de travail douteuses et mes râleries quotidiennes. Merci pour tous les gâteaux que tu nous as faits, et les petits suc's bien entendu. Merci pour ces kilomètres parcourus à pied tous les deux, que ce soit pour notre tour de course à pied hebdomadaire, pour courir un marathon ou explorer les montagnes.

Merci beaucoup Yohan pour partager ma vie depuis le début de cette thèse, trois ans en coloc', c'est une belle performance je pense. Merci pour les rigolades, pour les discussions jusqu'à point d'heure sur la vie et ses alentours. Merci d'accepter mes choix de vie souvent idiot, d'être un des rares à capter mes blagues les plus techniques et d'être toujours sur le pont pour sortir ou manger des pizzas quand on a la flemme de cuisiner.

Merci beaucoup Alex de m'avoir parlé de tes zircons et de tes BIFs pour me maintenir dans ma passion pour les cailloux. Merci aussi de m'avoir accompagné dans ce projet fou à travers les Pyrénées et d'avoir supporté le rythme et mon caractère pendant plus de deux semaines.

Merci aux fantastiques de l'être toujours autant. Merci pour ces virées parisiennes où vous m'accueillez toujours, pour ces moments au Boulou, merci pour l'écoute, merci pour les jeux, merci Eli, merci Adil, merci Bryan, merci Léa, merci Laz. Merci Clémence d'être venue voir Aigues-Mortes et les Saintes-Maries avec moi et de toujours penser à moi pour les conseils de jardinage. Merci Léa pour les moments passés ensemble dans les Causse, d'avoir accepté mes virées qui finissaient souvent en galère sans trop me maudire, pour ces discussions à propos de tout et de n'importe quoi.

Merci aux amis et amies de prépa qui sont toujours là pour se faire une chouille ou une bouffe de temps en temps, merci Quentin, merci Thibault, merci Paul, merci Florian, merci Johny (désolé mais Loïc, je n'y arriverai jamais), merci Théo, merci Valentine. Merci beaucoup Bérénice pour les longues heures passées à jouer à Wingspan, parfois même depuis le bureau, et le point d'honneur que tu mettais à me laisser gagner. Merci pour les escapades à droite à gauche, pour les matchs de rugby que nous avons vu, pour notre passion pour le gras et pour tout le reste.

Enfin, je tiens à vous remercier, famille, parents, frère et sœurs, pour toujours être là au besoin et me soutenir dans ce que j'entreprends, malgré ma distance.



TABLE DES MATIÈRES

Résumé	1
Summary	2
Introduction générale	3
La reproduction des plantes à fleurs	4
L'importance des traits pour le système de reproduction	9
Les moteurs de l'évolution des systèmes de reproduction	13
L'écologie de la résurrection et la pensée des champs comme outils	15
1 Retour vers le passé : patrons d'évolution contemporaine du système de reproduction et des traits associés	27
Manuscrit 1 : Évolution contemporaine et convergente d'un syndrome d'autofécondation menaçant les interactions plantes-pollinisateurs	28
Manuscrit 2 : Conséquences de l'évolution rapide de l'autofécondation sur le ratio pollen/ovule et l'hétéromorphisme pollinique	50
2 De la caractéristique à la fonction : rôle des traits constituant le syndrome d'autofécondation	67
Manuscrit 3 : Traits intervenant dans l'allofécondation sous pollinisation libre chez une plante partiellement autogame – différences entre les fonctions mâle et femelle	68
3 Scénarios pour l'évolution rapide de l'autofécondation et du syndrome associé	89
Manuscrit 4 : Caractérisation de l'évolution rapide du syndrome d'autofécondation – dépression de consanguinité, héritabilité et intensité de sélection	90
Discussion générale	105
De l'importance d'intégrer les dynamiques évolutives dans les dynamiques écologiques . . .	107
Le syndrome d'autofécondation, un ensemble composite	112
Et quand l'humain n'est pas responsable	115
Digression : ma découverte du monde des médias, la pensée et le bourdon	123

Résumé

À la faveur d'une promenade printanière au cœur de la nature, il n'est pas rare de profiter du spectacle qu'offre la floraison. Les formes et les couleurs des fleurs viennent capturer le regard. Ces appareils jouent un rôle fondamental dans la reproduction. La fleur est le siège de la reproduction sexuée pour les plantes qui en possèdent. Elle porte à la fois des pièces florales fertiles, généralement mâles et femelles, et des pièces florales stériles comme les pétales. Le rôle de ces pièces florales stériles est d'aider à la rencontre des gamètes, la pollinisation. La large majorité des plantes à fleurs sont pollinisées par des insectes, aussi, au spectacle des formes et des couleurs se superpose un ballet papillonnant, et bourdonnant. Or, ces pollinisateurs sont actuellement menacés par les activités humaines. Cette thèse s'appuie sur l'hypothèse que, en plus de rendre nos printemps silencieux, le déclin actuel des pollinisateurs impacte le système de reproduction des plantes à fleurs. En l'absence de pollinisateurs, la reproduction avec soi-même, l'autofécondation, est une solution pour maintenir une descendance. Cette thèse rend compte de l'évolution récente du système de reproduction d'une plante à fleurs, la pensée des champs (*Viola arvensis*), et notamment de ses traits floraux, pour ensuite comprendre si le déclin des pollinisateurs peut en être à l'origine.

Pour mesurer l'évolution d'une population, il est nécessaire d'avoir au moins deux points de comparaison espacés dans le temps. L'écologie de la résurrection permet d'accéder aux traits de populations passées sans nécessiter qu'ils aient été eux-mêmes mesurés dans le passé. En effet, cette méthode permet de comparer des individus issus de populations ancestrales, conservés grâce à leur dormance, à des individus actuels descendants de cette population ancestrale. La structure génétique et les traits des populations ancestrales sont capturés et conservés par les individus en dormance et peuvent aisément être révélés en levant cette dormance. Il est alors possible de faire pousser côte-à-côte, dans le même environnement, ancêtres et descendants, ce qui permet de caractériser l'évolution entre les deux. Cette méthode a été utilisée sur quatre populations de pensée des champs échantillonnées dans le Bassin parisien, une première fois dans les années 1990-2000, puis une seconde fois en 2021.

En alliant mesures de la structure génétique des populations, mesures phénotypiques et expériences de choix par des pollinisateurs, cette thèse montre que les quatre populations actuelles de pensée des champs se reproduisent avec des taux d'autofécondation plus élevés, produisent des fleurs aux pétales plus petits, produisent moins de nectar, et sont finalement moins attractives que leurs ancêtres. Le fait que ces changements ne soient pas juste liés à l'augmentation de la consanguinité associée à l'autofécondation est confirmé par des mesures de dépression de consanguinité très faibles. L'ensemble des traits ayant évolué forment ce qui est appelé un syndrome d'autofécondation, commun chez les espèces très autogames. L'importance de ces traits dans la réalisation de l'autofécondation a été quantifiée pour les voies mâle et femelle. Les traits modulant l'autofécondation *via* l'interaction avec les pollinisateurs sont ceux qui ont évolué. Enfin, l'absence d'évolution des traits étant indépendants des pollinisateurs malgré leur héritabilité élevée, comme la longueur du sépale, renforce l'hypothèse que le déclin des pollinisateurs est à l'origine de l'évolution observée.

En plus de le rendre silencieux, le déclin des pollinisateurs menacerait donc aussi les formes et les couleurs de nos printemps avec le développement du syndrome d'autofécondation. Ce syndrome tend à rompre les interactions avec les pollinisateurs et pourrait avoir un effet d'emballement sur leur déclin. Cette évolution menacerait alors l'ensemble de la chaîne trophique.

Summary

On a springtime walk, it is not uncommon to enjoy the spectacle of flowers in bloom. The shapes and colors of the flowers capture the gaze. These features play a fundamental role in reproduction. The flower is where sexual reproduction occurs in flowering plants. It carries both fertile floral parts, generally male and female, and sterile floral parts such as petals. The role of these sterile floral parts is to help the gametes encounter, the pollination. The vast majority of flowering plants are pollinated by insects, so the spectacle of shapes and colors is superimposed on a buzzing ballet. Yet, these pollinators are currently threatened by human activity. This thesis is based on the assumption that, in addition to rendering our springs silent, the current pollinator declines impacts the reproductive system of flowering plants. In the absence of pollinators, reproduction with oneself – self-fertilization or selfing – is a solution to produce offspring. This thesis reports on the recent evolution of the reproductive system of a flowering plant, the field pansy (*Viola arvensis*), and in particular its floral traits, in order to understand whether the pollinator declines may be the cause.

To analyze the evolution of a population, at least two points of comparison spaced over time are necessary. Resurrection ecology provides access to the traits of past populations without the need for them to have been measured in the past. Indeed, this method compares individuals from ancestral populations, preserved thanks to their dormancy, with current individuals descended from this ancestral population. The genetic structure and traits of the ancestral populations are captured and preserved by dormancy, and can easily be revealed by breaking it. It is then possible to grow ancestors and descendants side-by-side, in the same environment, making it possible to characterize the evolution between the two. This method has been used on four populations of field pansy sampled in the Paris Basin, first in 90s-2000s, then a second time in 2021.

By combining measurements of population genetic structure, phenotypic measurements and pollinator behavior experiments, this thesis shows that the four current populations of field pansy reproduce with higher selfing rates, produce flowers with smaller petals, produce less nectar, and are ultimately less attractive to pollinators than their ancestors. The fact that these changes are not just linked to increased inbreeding associated to selfing is confirmed by very low measures of inbreeding depression. Together, these evolved traits form what is known as a selfing syndrome, common in highly selfing species. The importance of these traits for selfing has been quantified for both the male and female pathways. Traits modulating selfing *via* interaction with pollinators are those that have evolved. Finally, the absence of evolution in traits that are independent of pollinators despite their high heritability, such as sepal length, reinforces the hypothesis that pollinator declines are at the origin of the observed evolution.

As well as making it silent, the pollinator declines could also threaten the shapes and colors of our springs, with the development of the selfing syndrome. This syndrome tends to disrupt interactions with pollinators which could have a runaway effect on their declines. Therefore, this evolution could threaten the entire trophic chain.

Introduction générale



*To make a prairie it takes a clover and one bee,
One clover, and a bee,
And revery.
The revery alone will do,
If bees are few.*

Emily Dickinson

Durant plus d'une centaine d'années, la culture de la vanille (*Vanilla planifolia*, Andrews, 1808) en dehors d'Amérique centrale a été infructueuse. Les plantes fleurissaient mais aucune gousse, le fruit, n'en résultait. Ce n'est qu'en 1841, à la Réunion, qu'Edmond Albius, alors esclave âgé de 12 ans, découvre une technique pour faire fructifier la vanille en pollinisant manuellement les fleurs et obtenant ainsi les gousses si recherchées. Cette technique, toujours utilisée aujourd'hui, permettra l'essor de la production à la Réunion puis dans tout l'Océan Indien (Bory et al., 2008). Le prix élevé de cette épice, deuxième plus chère au monde après le safran, est lié au labeur que représente la pollinisation manuelle. Derrière cette réussite agronomique et économique (Fouché and Jouve, 1999), étroitement liée à la mondialisation et à l'histoire coloniale française, se cache une histoire naturelle. En effet, en Amérique centrale, son aire d'origine, *Vanilla planifolia* est pollinisée par des abeilles euglossines (Euglossini), elles-mêmes présentes seulement en Amérique du Sud et centrale (Bory et al., 2008). En absence de pollinisateur, *Vanilla planifolia* est donc incapable de se reproduire. Bien que les fleurs portent les organes mâles et femelles à proximité les uns des autres, le dépôt du pollen d'une fleur sur son propre stigmate nécessite une légère manipulation de la fleur, qui suffit à produire des fruits chargés de graines (Fouché and Jouve, 1999). Alors que la pollinisation naturelle entraîne plutôt une fécondation croisée entre deux individus, une allofécondation, la pollinisation manuelle entraîne une reproduction avec soi-même, une autofécondation (Bory et al., 2008). Une même plante à fleurs hermaphrodites peut donc à la fois se reproduire de manière croisée et avec elle-même (Lloyd and Schoen, 1992), ce qui amène à se questionner sur la coexistence de ces deux stratégies (Lloyd, 1992).

Cette thèse se focalise sur le système de reproduction (*mating system* en anglais) des plantes. Traditionnellement limité à la balance entre autofécondation et allofécondation à l'échelle de la population (Cardoso et al., 2018), ce concept sera élargi à la reproduction préférentielle entre certains individus selon leurs traits, plus communément étudiée chez les animaux sous la terminologie de « choix du partenaire ». En se basant sur une approche empirique utilisant l'écologie de la résurrection, les buts sont de tester l'évolution rapide du système de reproduction, de comprendre le lien avec les traits floraux et les mécanismes sous-jacents à cette évolution en prenant des populations sauvages de pensée des champs (*Viola arvensis*) pour modèle, avant de discuter nos résultats pour les angiospermes plus largement.

I La reproduction des plantes à fleurs

La reproduction est une fonction fondamentale en biologie. C'est ainsi que les individus existants donnent naissance à de nouveaux individus, leurs descendants. La reproduction a de nombreuses conséquences, démographiques bien entendu, mais également évolutives. C'est *via* elle que l'information génétique est transmise d'un individu à ses descendants et c'est la variabilité de succès reproducteur entre les individus qui module les fréquences alléliques au sein des populations. Le nombre de descendants produit par un individu est appelé succès reproducteur. La contribution variable des individus à la génération suivante peut être le résultat du tirage aléatoire du succès reproducteur de chaque individu, la population est alors soumise à la dérive génétique (Crow and Kimura, 1970), ou bien le résultat d'allèles conférant à leur porteur la capacité de produire plus de descendants que les autres, c'est-à-dire une plus grande *fitness* (ou valeur sélective en français), fondement de la sélection naturelle (Darwin, 1859).

I.1 Reproduction sexuée : fonctionnement et conséquences

Il existe deux types de reproduction : sexuée et asexuée. Contrairement à la reproduction asexuée, la reproduction sexuée nécessite la production de gamètes mâles et femelles. Les gamètes portent chacun la moitié du patrimoine génétique, se rencontrent et fusionnent afin de former le zygote qui, après développement, donnera un nouvel individu. Les chromosomes portés par les gamètes possèdent des combinaisons alléliques différentes des parents grâce aux événements de recombinaison ayant lieu lors de la méiose. La reproduction sexuée est donc un élément de diversification génotypique à la fois grâce à la mise en commun de l'information génétique portée par les gamètes mâles et femelles, mais également grâce à la recombinaison. La reproduction sexuée, contrairement à la reproduction asexuée, permet de produire des génotypes, et donc des phénotypes, inédits. Les variations génétiques peuvent résulter en une variation de la *fitness* des individus aboutissant à la sélection de certains génotypes.

La reproduction sexuée nécessite la rencontre du gamète mâle et du gamète femelle. Cependant, la rencontre directe des individus mâles et femelles, comme c'est le cas chez nous lors de l'accouplement, est impossible pour des organismes sessiles comme les plantes. Chez les angiospermes, seul le grain de pollen, qui contient le gamète mâle, est mobile lors de la reproduction. Or, ce dernier n'est pas flagellé ou motile, la rencontre nécessite donc généralement un vecteur qui peut être l'eau, le vent, ou bien d'autres êtres vivants appelés pollinisateurs. 80% à 90% des espèces d'angiospermes ont recours à des pollinisateurs (Ollerton et al., 2011). Près de 95% des espèces d'angiospermes sont hermaphrodites (Barrett, 2002 ; Igic and Kohn, 2006). Les gamètes mâles et femelles sont donc portés par le même

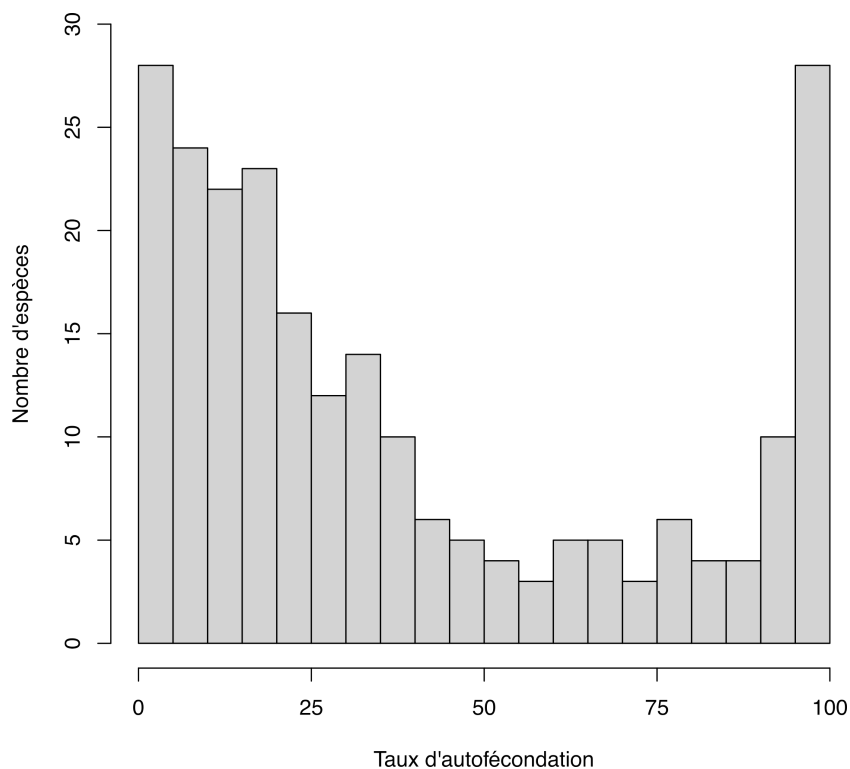


Figure 1 : Distribution du taux d'autofécondation chez les angiospermes (d'après des données fournies par Susan Kalisz)

individu, et même au sein de la même fleur pour 90% des espèces, ce qui peut malgré tout permettre leur rencontre sans vecteur extérieur (Barrett, 2002). Lorsque les gamètes donnant naissance à un nouvel individu sont issus du même parent on parle d'autofécondation, que l'on oppose à l'allofécondation lorsque les deux gamètes sont issus de deux parents différents. Il existe tout un continuum entre la production d'une descendance exclusivement par autofécondation ou par allofécondation avec au milieu des systèmes de reproduction mixtes (**Figure 1** ; Goodwillie et al., 2005 ; Iqbal and Kohn, 2006).

I.2 L'autofécondation, une fausse bonne idée ?

L'autofécondation peut se produire selon plusieurs modes : la cléistogamie, la géitonogamie, l'autofécondation facilitée et l'autofécondation autonome (**Figure 2** ; Lloyd and Schoen, 1992). La cléistogamie est particulière puisqu'elle correspond à l'autofécondation au sein d'une fleur qui ne s'ouvre jamais,

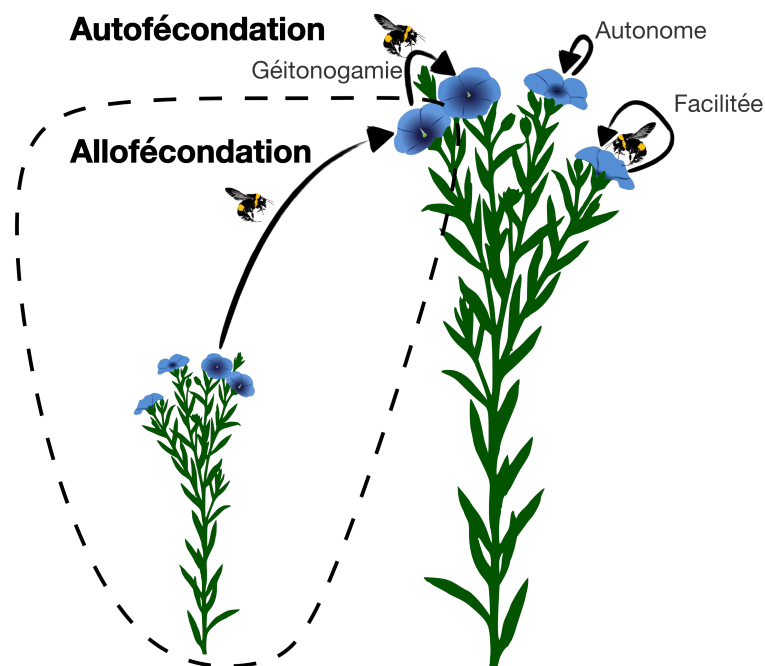


Figure 2 : Différents modes de reproduction sexuée d'une angiosperme hermaphrodite

l'allofécondation étant alors totalement impossible. La géitonogamie est la fécondation entre deux fleurs d'un même plant. Les autofécondations facilitée et autonome correspondent à une fécondation au sein d'une même fleur, la différence résidant dans le besoin pour l'autofécondation facilitée, comme la géitonogamie, de l'intervention d'un pollinisateur (Lloyd and Schoen, 1992). L'autofécondation autonome peut avoir lieu à différents moments de la vie de la fleur et implique une morphologie, ou des changements de morphologies durant l'anthèse, permettant le contact direct entre le pollen et le stigmate (Lloyd and Schoen, 1992). Le moment où l'autofécondation autonome se réalise implique une possibilité plus ou moins importante d'allofécondation (Lloyd and Schoen, 1992). En effet, les ovules et le pollen déjà utilisés pour l'autofécondation, ne peuvent plus l'être pour l'allofécondation, et inversement.

L'autofécondation offre deux avantages majeurs. Le premier est qu'elle permet de s'affranchir de la nécessité d'un vecteur, exceptions faites de l'autofécondation facilitée et de la géitonogamie, et d'un partenaire. Cela donne une assurance de reproduction aux individus capables d'autofécondation. Le second est l'avantage automatique de transmission des allèles (Fisher, 1941)¹. En effet, un parent transmet un unique allèle à sa descendance par allofécondation tandis qu'il en transmet deux par autofécondation. Les allèles favorisant l'autofécondation devraient donc pouvoir augmenter en fréquence et envahir la population rapidement (Lloyd and Schoen, 1992 ; Schoen et al., 1996). Cet avantage automatique de l'autofécondation peut être réduit selon le moment où l'autofécondation a lieu, voire est annulé dans le cas de la cléistogamie², le pollen utilisé pour l'autofécondation n'étant plus disponible pour l'allofécondation, empêchant la transmission d'allèles *via* l'export de pollen (Holsinger, 1991 ; Lloyd and Schoen, 1992 ; Porcher and Lande, 2005).

Malgré les avantages cités et bien que l'état ancestral des fleurs soit l'hermaphrodisme (Sauquet et al., 2017), l'autofécondation n'est pas prédominante chez les angiospermes (**Figure 1** ; Goodwillie et al., 2005 ; Igic and Kohn, 2006). La dépression de consanguinité a été le premier élément avancé pour expliquer cela (Lloyd, 1992). En effet, l'autofécondation entraîne la fusion de deux gamètes issus d'un même parent ce qui augmente la probabilité pour le descendant de porter des copies identiques sur les deux chromosomes, phénomène appelé homozygotie (**Figure 3**). L'homozygotie favorise l'expression de mutations délétères récessives, n'affectant jusqu'alors pas la fitness du parent à l'état hétérozygote (**Figure 3** ; Charlesworth and Charlesworth, 1987). L'expression des allèles récessifs délétères grâce à l'homozygotie permet, en revanche, de mieux les contre-sélectionner et ainsi réduire leur fréquence dans la population, phénomène appelé purge (**Figure 3** ; Lande and Schemske, 1985 ; Charlesworth and Charlesworth, 1987 ; Porcher and Lande, 2005). Cela limite donc l'effet négatif de la dépression de consanguinité sur l'autofécondation. Cependant, l'homozygotie diminue également la taille efficace de la population et la recombinaison effective ce qui réduit la réponse à la sélection et donc le potentiel adaptatif de la population (Glémin et al., 2006 ; Noël et al., 2017). En plus de la dérive liée à la diminution de la taille efficace, les événements de sélection entraînent également une baisse de la diversité génétique des populations à cause de la liaison entre le locus (portion d'ADN souvent pris comme équivalent physique d'un gène) soumis à sélection et les autres loci liés sur le chromosome. Ce phénomène est appelé auto-stop génétique (**Figure 3**). Il est important dans les populations autofécondes en raison de leur faible recombinaison effective et donc de l'importante liaison entre les loci (Hartfield et al., 2017 ;

¹Le journal dans lequel cet article a été publié nous rappelle les liens étroits entre la génétique des populations et les théories eugénistes à ses débuts, liens qui, je l'espère, sont désormais définitivement rompus.

²Fisher utilise pourtant, à tort, cet exemple pour illustrer sa théorie dans l'article de 1941.

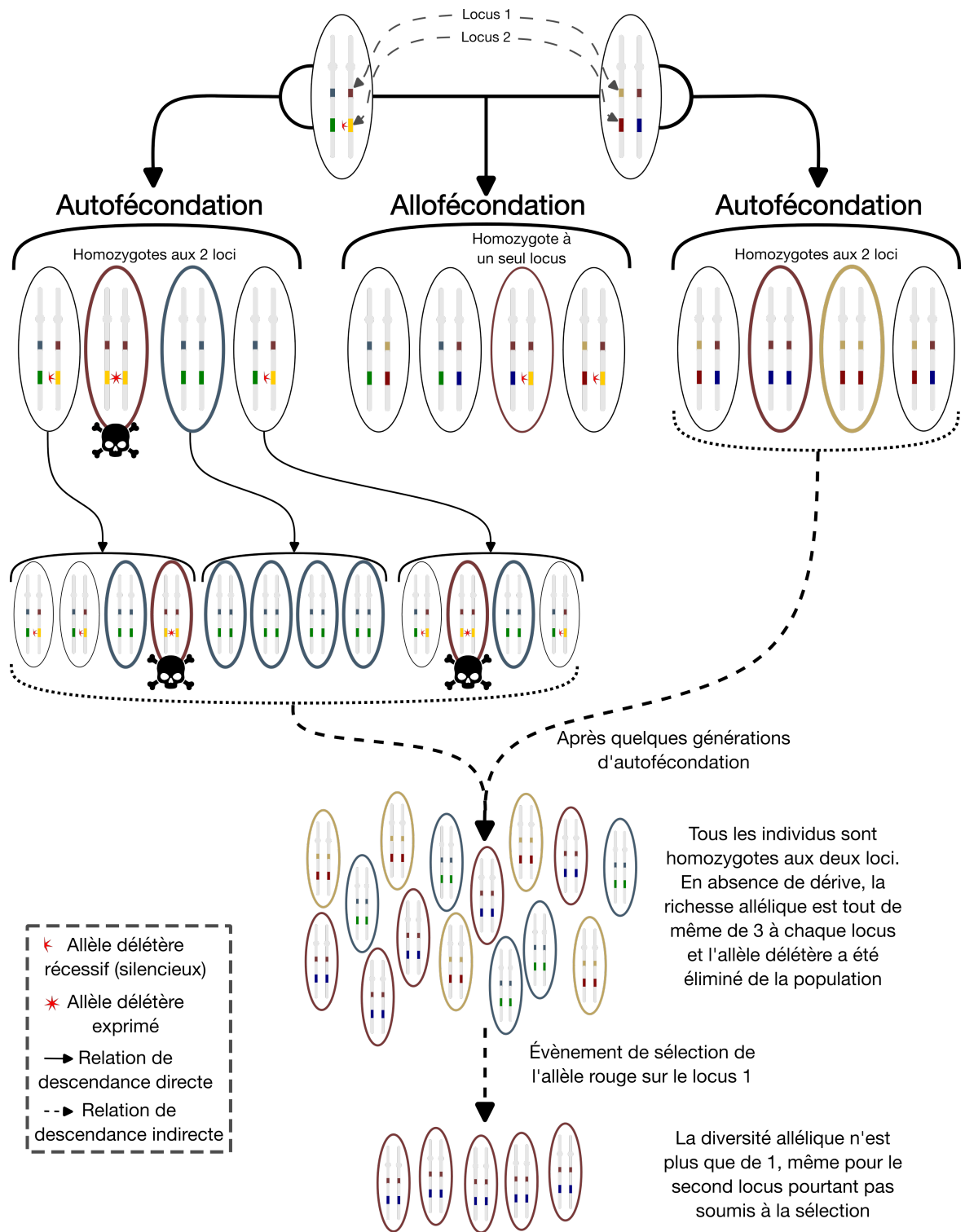


Figure 3 : Effets de l'autofécondation sur la structure génétique d'une population
 La recombinaison n'est pas prise en compte dans ce schéma. La dépression de consanguinité liée à l'allèle délétère est considérée comme totale. Les individus homozygotes à ce locus, exprimant alors l'allèle, ne donnent donc pas de descendants.

Busch et al., 2022). En conséquence, chaque évènement de sélection appauvrit considérablement la diversité génétique de la population, réduisant la capacité à s'adapter à un futur évènement de sélection (**Figure 3**).

Cette perte de capacité adaptative des populations s'autofécondant, malgré les avantages de l'autofécondation à court terme, a conduit à faire l'hypothèse qu'il s'agit d'un cul-de-sac évolutif (Dobzhansky, 1950 ; Stebbins, 1957). Cette hypothèse implique que l'évolution vers l'autofécondation n'est pas réversible et que les taxons la pratiquant ont un taux de diversification net négatif (Takebayashi and Morrell, 2001). Cette hypothèse est soutenue par les études phylogénétiques montrant que l'autofécondation est généralement un caractère dérivé, apparu récemment dans les lignages (Schoen et al., 1997 ; Igic and Kohn, 2001 ; Igic et al., 2004, 2006). Les nouvelles méthodes d'analyse comparative, utilisant les données phylogénétiques, ont permis de renforcer cette hypothèse (Maddison et al., 2007 ; Goldberg and Igic, 2008 ; Helmstetter et al., 2023). En prenant pour modèle la large famille des Solanacées, comprenant de nombreuses espèces que nous cultivons dont les pommes de terre, tomates, poivrons ou encore aubergines, il a été montré que l'évolution vers l'autocompatibilité, permettant l'autofécondation, est bien un cul-de-sac évolutif (Goldberg et al., 2010 ; mais voir Zenil-Ferguson et al., 2019). Bien que les espèces autocompatibles montrent un taux de spéciation plus élevé que les espèces autoincompatibles, cohérent avec un flux génétique moindre entre des populations autogames, le taux d'extinction est lui aussi plus élevé chez les espèces autocompatibles et même supérieur au taux de spéciation, conduisant donc à un taux de diversification net négatif (Goldberg et al., 2010). Pour les autoincompatibles, en revanche, le taux de spéciation est supérieur au taux d'extinction résultant en un taux de diversification net positif (Goldberg et al., 2010). Au sein de cette famille, les espèces qui évoluent vers l'autocompatibilité, et donc potentiellement l'autofécondation, le font donc de manière irréversible et cela les conduit à une extinction certaine. Même si la question de l'autofécondation en tant que cul-de-sac évolutif n'est pas totalement tranchée (Igic and Busch, 2013 ; Zenil-Ferguson et al., 2019), cela expliquerait qu'une variété de mécanismes empêchant l'autofécondation ait été maintenue chez les angiospermes (Lloyd and Schoen, 1992 ; Barrett, 2010 ; Goldberg et al., 2010).

II L'importance des traits pour le système de reproduction

La génétique des populations se focalisant sur la transmission des gènes selon leurs allèles, elle s'intéresse peu au phénotype qui, lui, est pourtant directement observable. Or, la reproduction est médiée par le phénotype des individus, les traits de leurs fleurs par exemple chez les angiospermes. Un trait phénotypique, ou simplement trait, est une caractéristique observable et mesurable chez un individu, comme la taille des fleurs, la présence ou non de dormance des graines, ou la quantité d'anthocyanes dans les pétales. La valeur d'un trait est le résultat des effets combinés de l'expression de l'information génétique et de l'environnement. Une partie de la valeur d'un trait peut donc être expliquée par l'environnement dans lequel il est exprimé, c'est la plasticité phénotypique (par exemple, Wolfe and Mazer, 2005 ; De Storme and Geelen, 2014 ; Schiestl et al., 2014). L'autre partie est expliquée par le génotype de l'individu qui le porte et est en partie transmise à ses descendants, c'est l'héritabilité (Cockerham and Weir, 1984 ; Kelly, 1999 ; Kelly and Arathi, 2003). L'héritabilité est fondamentale pour la sélection de certains allèles responsables de la valeur d'un trait et donc l'évolution de ce trait (Kelly, 1999 ; Kelly and Arathi, 2003).

II.1 Un ménage à trois

Les plantes ont la particularité d'impliquer un troisième acteur pour la rencontre entre leurs gamètes, exceptions faites des cas de fécondation autonome ou de cléistogamie (**Figure 2**). Les angiospermes zoogames sont parmi les seules pour lesquelles ce troisième acteur est un autre être vivant, qui plus est non conspécifique³, le pollinisateur (mais voir Lavaut et al., 2022). Cette interaction tripartite modifie la compréhension des traits interagissant lors de la reproduction et leur mode d'interaction (Delph and Ashman, 2006). Certains traits, comme les mécanismes d'autoincompatibilité ou encore la vitesse de croissance du tube pollinique et la longueur du style, peuvent interagir directement entre les deux partenaires sexuels une fois le pollen déposé sur le stigmate (par exemple, Kubo et al., 2010 ; McCallum and Chang, 2016). D'autres sont médiés par les traits du pollinisateur, comme ses préférences pour certaines couleurs ou les grosses fleurs (par exemple, Bell, 1985 ; Campbell, 1989 ; Galen, 1989 ; Benitez-Vieyra et al., 2006 ; Sletvold et al., 2010 ; Hansen et al., 2012). Enfin, il est tout à fait envisageable que certains traits interagissent au niveau des partenaires sexuels et du pollinisateur, et ce, pas nécessairement de manière concordante. C'est le cas notamment du nombre d'ouvertures présentes sur les grains de pollen (Dajoz et al., 1991). Le nombre d'ouvertures est négativement corrélé à la durée de viabilité du grain de pollen tandis qu'il l'est positivement à sa vitesse de germination (Dajoz et al., 1993). Ainsi, dans le cas d'un pollinisateur retardant l'export du pollen, à cause d'une prise en charge tardive ou d'un temps de transport avant dépôt plus grand, la production de grains de pollen avec peu d'ouvertures est favorisée. En revanche, une fois déposés sur le stigmate, les grains de pollen viables possédant le plus grand nombre d'ouvertures sont favorisés. Cette discordance entraîne la stabilité de stratégies mixtes consistant en la production, par un même individu, de plusieurs morphes de grains de pollen possédant plus ou moins d'ouvertures, phénomène appelé hétéromorphisme pollinique (Till-Bottraud et al., 1994).

Le système de reproduction d'une plante hermaphrodite est donc la résultante des interactions de ses fonctions mâle et femelle avec d'autres individus conspécifiques, avec des pollinisateurs, et avec elle-même en cas d'autofécondation. Pour la fécondation autonome ou la cléistogamie il n'y a pas intervention de pollinisateurs, les traits mis en jeu peuvent donc être indépendants de ceux utilisés pour l'allofécondation. Cependant la fécondation autonome n'est pas nécessairement exclusive et peut être en compétition avec l'allofécondation, résultant en un système mixte (Lloyd and Schoen, 1992 ; Goodwillie et al., 2005 ; Igic and Kohn, 2006). Les traits floraux permettant ou non l'autofécondation peuvent donc entrer en interférence avec ceux permettant l'allofécondation.

II.2 Les barrières à l'autofécondation

Certains traits ne permettent pas l'autofécondation. Le plus caricatural est la dioécie, consistant en la séparation des sexes entre les individus (Barrett, 2002, 2010 ; Cardoso et al., 2018). D'autres traits peuvent également limiter l'autofécondation au sein d'une fleur hermaphrodite, en séparant spatialement les organes mâle et femelle ou temporellement la maturité de ces organes, traits appelés herkogamie ou dichogamie respectivement (Barrett, 2002 ; Cardoso et al., 2018). Outre ces barrières physiques, d'autres barrières physiologiques peuvent également être présentes. C'est le cas des systèmes

³Dans certains groupes sociaux comme chez l'humain, les conspécifiques, notamment les parents, peuvent exercer une influence importante sur le choix du partenaire.

d'autoincompatibilité qui permettent à la plante de reconnaître et rejeter ses propres grains de pollen (Raduski et al., 2012). Ces systèmes reposent sur des voies génétiques impliquant la reconnaissance du soi ou du non-soi (Kubo et al., 2010).

Ces systèmes d'autoincompatibilité sont répandus dans l'arbre des angiospermes et souvent ancestraux à une ou plusieurs familles (Igic and Kohn, 2001). Cependant, de nombreuses ruptures du système d'autoincompatibilité sont observées indépendamment au cours de l'évolution, permettant alors l'autofécondation (Igic et al., 2008). Ces ruptures sont expliquées par les avantages, au moins à court terme, de l'autofécondation (Igic et al., 2008). De manière générale, la transition de l'allofécondation vers l'autofécondation est considérée comme une des transitions évolutives les plus fréquentes chez les angiospermes (Stebbins, 1957 ; Barrett, 2010).

II.3 Le syndrome d'autofécondation

La comparaison d'espèces ou de populations pratiquant l'autofécondation avec des proches pratiquant l'allofécondation a mis en évidence un ensemble de changements de traits floraux caractéristiques, appelé syndrome d'autofécondation (**Figure 4** ; Ornduff, 1969 ; Sicard and Lenhard, 2011). Les traits impliqués les plus évidents sont ceux qui permettent l'autofécondation, *i.e.* une rupture des systèmes d'autoincompatibilité (Igic et al., 2008 ; Sicard et al., 2011 ; Raduski et al., 2012), ainsi qu'une réduction voire disparition de la dichogamie et de l'herkogamie (Lloyd, 1965 ; Schoen, 1982 ; Bodbyl Roels and Kelly, 2011 ; Brys and Jacquemyn, 2012). Ce qui est moins évident de prime abord est la diminution de la taille de corolle, de la production de composés volatils et de nectar, des contrastes colorés et des guides floraux, ou encore du nombre de grains de pollen produits par ovule produit (Lloyd, 1965 ; Cruden, 1977 ; Ritland and Ritland, 1989 ; Sicard et al., 2011 ; Brys and Jacquemyn, 2012 ; Gervasi and Schiestl, 2017). Excepté le ratio pollen/ovule, ces traits sont liés à une moindre attractivité pour les pollinisateurs (par exemple, Bell, 1985 ; Galen, 1989 ; Hansen et al., 2012 ; Gervasi and Schiestl, 2017). L'évolution vers l'autofécondation est donc corrélée à une moindre attractivité des plantes pour les pollinisateurs, jusqu'à une rupture complète de l'interaction dans le cas des populations totalement autofécondes. Lors d'une augmentation de la capacité d'autofécondation, la balance coût-bénéfice de la production des traits attirant les pollinisateurs est déséquilibrée du côté du coût, coût qui est réduit par la diminution de l'investissement dans ces structures, investissement qui peut alors être réalloué à d'autres fonctions (Pyke, 1991).

La réduction du ratio pollen/ovule n'implique pas directement les pollinisateurs *a priori*. Elle s'explique aisément, en revanche, en considérant que le nombre de grains de pollen nécessaires pour féconder un ovule est moindre en cas d'autofécondation par rapport à l'allofécondation, sauf peut-être en cas de géitonogamie, car moins de grains de pollen sont perdus lors des différentes étapes de la pollinisation. L'autofécondation serait donc plus efficace pour le transfert de pollen (Lloyd, 1965 ; Cruden, 1977 ; Harder and Johnson, 2023). Un autre argument, qui n'invalidé pas nécessairement le premier, implique la théorie d'allocation sexuelle qui est la balance de d'allocation des ressources entre les fonctions mâle et femelle afin d'optimiser la *fitness* (Charnov, 1982 ; Harder and Johnson, 2023). L'augmentation de la capacité d'autofécondation augmenterait la compétition locale pour la fécondation pour le pollen autofécondant, ce qui impliquerait une réduction de l'allocation à la fonction mâle et donc une augmentation de celle à la fonction femelle (Charnov, 1982).



Figure 4 : Deux espèces proches mettant en évidence un syndrome d'autofécondation
 À gauche, *Capsella grandiflora* est autoincompatible et donc allogame, tandis qu'à droite, *Capsella rubella* est autocompatible et autogame. Ces deux espèces ont divergé il y a à peine 30 000 ans. Tiré de Sicard *et al.* (2011), avec la permission d'Oxford University Press.

Le syndrome d'autofécondation a été relativement peu étudié sur le plan génétique (Sicard and Lenhard, 2011 ; Sicard *et al.*, 2011). Les traits floraux sont généralement hautement héréditaires ce qui favorise leur évolution (Ashman and Majetic, 2006). Ils présentent une grande variabilité inter- et intraspécifique, ce qui est assez paradoxal s'ils sont soumis à une forte sélection, réduisant *a priori* la variabilité du trait. La recherche des loci responsables des variations de traits entre les espèces pratiquant l'autofécondation et celles pratiquant l'allofécondation a montré que plusieurs loci, avec un faible effet individuel, sont généralement responsables des changements (Sicard and Lenhard, 2011). Un locus peut affecter plusieurs traits floraux, ce qui révèle une intégration de l'architecture génétique de la fleur et explique en partie l'importante corrélation génétique généralement mesurée entre les traits floraux (Ashman and Majetic, 2006 ; Sicard and Lenhard, 2011). Cette corrélation rend l'évolution des traits non-indépendante. Un résultat surprenant est l'indépendance de traits floraux par rapport aux traits végétatifs lors de l'évolution du syndrome d'autofécondation (Ashman and Majetic, 2006 ; Sicard and Lenhard, 2011), alors que les mutants floraux de modèles biologiques, comme *Arabidopsis thaliana* ou *Antirrhinum majus*, présentent systématiquement une modification du même ordre au niveau végétatif (Breuninger and Lenhard, 2010). L'évolution du syndrome d'autofécondation implique donc plutôt de nombreux loci de faible effet mais très spécifiques des traits ciblés plutôt que des loci à effet fort mais peu spécifiques.

La dynamique de mise en place du syndrome d'autofécondation est en revanche encore mal comprise. La principale étude d'évolution expérimentale montre une augmentation de la capacité d'autofécondation en à peine cinq générations en l'absence de pollinisateur chez *Mimulus guttatus* (Bodbyl Roels and Kelly, 2011). Parmi les traits morphologiques mesurés, seule l'herkogamie semble avoir évolué de manière différente en présence ou absence de pollinisateurs et sa diminution est bien corrélée avec l'augmentation du nombre de graines produites en autofécondation (Bodbyl Roels and Kelly, 2011). Des populations de *Centaureum erythraea* présentant des aptitudes plus importantes à l'autofécondation possèdent aussi tout un ensemble de traits correspondant au syndrome d'autofécondation (faibles herkogamie, taille de corolle, affichage floral, ratio pollen/ovule ; Brys and Jacquemyn, 2012). Cepen-

dant ni le potentiel adaptatif de la population ancestrale, ni la date de divergence entre les populations plus ou moins autofécondes n'ont été estimés, aussi il est difficile de connaître le chemin évolutif et la vitesse d'évolution ayant mené à la divergence de ces populations. Dans ces deux études, la raréfaction ou l'absence des pollinisateurs est vraisemblablement responsable de l'évolution vers un syndrome d'autofécondation.

III Les moteurs de l'évolution des systèmes de reproduction

Il existe une variété de systèmes de reproduction, eux-mêmes responsables de la diversité génétique au sein des populations. Or l'étude des variations du vivant étant le cœur de l'écologie évolutive, les systèmes de reproduction constituent un sujet de choix. L'origine de la diversité des systèmes de reproduction des angiospermes, et la diversité elle-même, ont été la source de nombreux débats (Schemske and Lande, 1985 ; Goodwillie et al., 2005, 2010 ; Igic et al., 2006). Un papier séminal utilisant un modèle génétique présente les systèmes uniquement autogame ou uniquement allogame comme les deux seuls équilibres stables des systèmes de reproduction (Lande and Schemske, 1985). L'existence de nombreuses populations présentant des systèmes mixtes a été alors généralement expliquée par un état transitionnel entre l'allofécondation et l'autofécondation (Lande and Schemske, 1985 ; Igic and Kohn, 2006). Cette transition devrait avoir lieu en quelques dizaines de générations grâce à la rapide purge génétique en cas d'autofécondation (Lande and Schemske, 1985 ; Charlesworth and Charlesworth, 1987). Cependant, 40% des espèces d'angiospermes présenteraient un système de reproduction mixte (Goodwillie et al., 2005, 2010 ; Igic and Kohn, 2006). Cette importante proportion de systèmes mixtes ne permet que deux hypothèses : soit, relativement à la durée de transition de l'allofécondation vers l'autofécondation, l'initiation de la transition est fréquente ou associée à une spéciation importante, soit les systèmes mixtes peuvent être stables (Winn et al., 2011). De nombreux modèles théoriques ont été développés pour tester la potentielle stabilité des systèmes de reproduction mixtes (voir Porcher and Lande, 2005, et les références incluses). Ces modèles diffèrent concernant les moteurs initiant l'évolution des systèmes de reproduction.

III.1 Un moteur purement intrinsèque ou bien également dépendant de l'environnement

La majorité des modèles utilisent deux forces antagonistes pour expliquer l'évolution des systèmes de reproduction, l'avantage automatique de l'autofécondation et la dépression de consanguinité. Selon ces modèles génétiques, la transition de l'allofécondation vers l'autofécondation devrait se faire naturellement dans une grande partie de l'espace des paramètres, l'avantage automatique de l'autofécondation prenant alors le pas sur la dépression de consanguinité (Lande and Schemske, 1985 ; Charlesworth and Charlesworth, 1987 ; Porcher and Lande, 2005).

Un autre moteur important pour l'évolution du système de reproduction chez les plantes est la pollinisation. Une diminution de l'activité de pollinisation diminue l'export de pollen et favorise la limitation pollinique, *i.e.* une production de graines limitée par le nombre de grains de pollen déposés sur le stigmate (Lloyd, 1992 ; Porcher and Lande, 2005 ; Harder and Aizen, 2010 ; Rodger et al., 2021). Les deux fonctions sexuelles, mâle et femelle, peuvent donc être réduites en cas de diminution de la

pollinisation et l'assurance de reproduction fournie par l'augmentation de l'autofécondation permet de pallier cette réduction (Lloyd, 1992 ; Thomann et al., 2013).

L'augmentation de l'autofécondation peut donc se faire à cause de facteurs purement génétiques, l'avantage automatique de l'autofécondation et une faible dépression de consanguinité, mais également écologiques, la pollinisation. L'importance relative de ces différents moteurs est mal comprise et peu de modèles théoriques impliquent les deux (Porcher and Lande, 2005). Des espèces actuelles ont un système de reproduction mixte en place depuis plus d'un siècle, comme *Ophrys apifera* dont le système mixte avait déjà été décrit par Darwin en 1862. Le fait qu'elles ne soient pas devenues totalement autogames indique que l'avantage automatique n'est probablement pas un moteur suffisant à lui seul. Expérimentalement, des études manipulant la pollinisation ont montré une évolution vers l'autofécondation (Bodbyl Roels and Kelly, 2011 ; Gervasi and Schiestl, 2017 ; Panique and Caruso, 2020), mais l'absence d'expériences, testant des espaces de paramètres où l'évolution du système de reproduction sans modification du régime de pollinisation est prédite, limite les conclusions quant à l'importance relative des moteurs génétique et écologique.

III.2 Le déclin des pollinisateurs, un moteur d'actualité

80 à 90% des angiospermes entretiennent une relation avec des pollinisateurs, vieille d'au moins cent millions d'années et probablement responsable de la diversification des plantes et des pollinisateurs (Ollerton et al., 2011 ; van der Niet and Johnson, 2012 ; Van der Niet et al., 2014 ; Benton et al., 2022 ; Stephens et al., 2023). La large majorité des angiospermes sont pollinisées par des insectes. Or, ces derniers font face à un déclin rapide et global lié aux activités humaines, au moins depuis les années 1970-1980 (Biesmeijer et al., 2006 ; Potts et al., 2010 ; Goulson et al., 2015 ; Hallmann et al., 2017 ; Grab et al., 2019 ; Janousek et al., 2023). Biesmeijer *et al.* (2006) ont montré que ce déclin des pollinisateurs est corrélé à un déclin des plantes dépendantes des pollinisateurs. Le déclin actuel est donc suffisant pour être responsable de la limitation de la reproduction des plantes entomogames et donc pour l'apparition ou l'augmentation de la limitation pollinique dans de nombreuses populations (Rodger et al., 2021).

Le déclin des insectes pollinisateurs peut donc entraîner une chute démographique et ultimement une extinction des populations d'angiospermes entomogames en limitant leur reproduction. Cependant, l'évolution du système de reproduction, vers plus d'autofécondation, peut sauver ces populations, c'est le sauvetage évolutif (Thomann et al., 2013 ; Cheptou, 2019). L'augmentation de l'autofécondation, autonome ou par cleistogamie, peut pallier la diminution de graines produites par fécondation croisée et donc permettre aux populations de retrouver un taux d'accroissement stable ou positif. Bien que la sélection de l'autofécondation en cas de moindre pollinisation ait été montrée en milieu expérimental (Bodbyl Roels and Kelly, 2011), une étude de l'effet du déclin des pollinisateurs sur l'évolution du système de reproduction en milieu naturel montre une évolution des traits vers un renforcement de l'interaction plante-pollinisateurs, ce qui est contraire aux attendus du syndrome d'autofécondation (Thomann et al., 2015). Cependant cette étude utilise le bleuet, *Cyanus segetum*, qui est une espèce autoincompatible. En l'absence de rupture du système d'autoincompatibilité, les traits renforçant l'attraction des quelques pollinisateurs encore présents seront sélectionnés (Thomann et al., 2013, 2015). Cette étude est donc bien un indice que le déclin des pollinisateurs actuel peut entraîner une évolution du système de reproduction des plantes entomogames en conditions naturelles, permettant un sauvetage évolutif.

Dans le cas du bleuets, ce sauvetage évolutif n'est effectif que tant qu'il reste suffisamment de pollinisateurs pour se reproduire. Dans le cas d'un sauvetage évolutif *via* l'augmentation de l'autofécondation, on peut se demander si ce sauvetage est réel (Cheptou, 2019). Comme mentionné plus haut, l'autofécondation peut représenter une « fausse bonne idée ». Elle peut être sélectivement avantageuse à court terme mais constituer un cul-de-sac évolutif à plus long terme (Goldberg et al., 2010 ; Igic and Busch, 2013 ; Cheptou, 2019). Pire encore, elle peut, dans une certaine gamme de paramètres, conduire au suicide évolutif en étant avantageuse évolutivement mais pas démographiquement (Cheptou, 2019). Le déclin des pollinisateurs pourrait donc mener de nombreuses espèces à un cul-de-sac évolutif. De plus, l'évolution de l'autofécondation et de son syndrome favorise la rupture de l'interaction plante-pollinisateurs, ce qui pourrait contribuer au déclin des pollinisateurs eux-mêmes (Weinbach et al., 2022). Les pollinisateurs pourraient alors souffrir d'un rétrocontrôle positif sur leur déclin à cause de l'évolution du système de reproduction des angiospermes. Les plantes étant à la base des écosystèmes terrestres (Benton et al., 2022), il s'agirait d'une potentielle bombe à retardement pour la biodiversité. Pour tester ces hypothèses, il est nécessaire d'avoir accès au système de reproduction passé des populations actuelles pour retracer leur évolution.

IV L'écologie de la résurrection et la pensée des champs comme outils

IV.1 L'écologie de la résurrection, une puissante méthode en évolution

L'écologie de la résurrection est une méthode bien mal nommée. Il n'est en effet nullement question de ressusciter quoi que ce soit mais plutôt d'utiliser une propriété d'êtres bien vivants, la dormance (Weider et al., 2018). La dormance est un état d'activité métabolique très bas, maintenant les organismes dans un état physiologique constant. C'est une propriété que possèdent des bactéries, certains animaux au stade embryonnaire et les végétaux sous forme de graine (Weider et al., 2018). La dormance permet d'attendre que les conditions soient favorables pour le développement, auquel cas des signaux environnementaux lèvent la dormance. Ainsi, la vernalisation lors des grands froids de l'hiver lève la dormance de nombreuses plantes annuelles, ou encore en Méditerranée, le passage d'un feu lève la dormance des graines de cistes, recolonisant ainsi rapidement le milieu en absence de compétition. L'écologie de la résurrection consiste à récupérer des propagules dormantes, produites il y a plusieurs générations, et à lever leur dormance pour les faire croître parallèlement à leurs descendants (Weider et al., 2018). Cette méthode s'apparente donc plus à la Belle au bois dormant attendant d'être réveillée qu'à la résurrection christique.

Il est possible de récupérer les propagules dormants conservés *in situ* mais également de les conserver *ex situ*, par exemple dans des frigos pour les graines, augmentant généralement leur viabilité (Franks et al., 2007 ; Weider et al., 2018). En 2005, des graines de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) âgées de 2000 ans conservées *in situ* ont réussi à germer, révélant le potentiel de conservation des graines (Sallon et al., 2008). Tel un voyage dans le temps, l'utilisation de graines anciennes permet d'obtenir un état de référence des traits, quand bien souvent aucune mesure de cet état de référence n'est disponible. De plus, à la différence des suivis temporels, la comparaison directe entre des individus ancestraux et

leurs descendants en jardin commun permet de comparer leurs traits en s'affranchissant des différences d'environnement entre les deux époques (Franks et al., 2018). Ainsi les différences phénotypiques peuvent directement être reliées à des différences génotypiques et donc à l'évolution génétique des populations (Franks et al., 2018). C'est donc un outil puissant pour rendre compte de l'évolution en réponse aux changements globaux récents (Franks et al., 2018).

Cette méthode demande cependant certaines précautions. En premier lieu, il est important d'effectuer une génération de rafraîchissement pour les ancêtres et les descendants (Franks et al., 2018). Cette première génération, effectuée en jardin commun, en évitant tout brassage génétique entre les lignées ancestrales et descendantes, permet d'homogénéiser les effets maternels et ainsi éviter que les différences mesurées entre les ancêtres et leurs descendants ne soient liées à une année plus ou moins bonne lors de la récolte, ayant donné des graines plus ou moins vigoureuses (Franks et al., 2018). Cette génération de rafraîchissement permet aussi de construire des familles, *i.e.* des lots de plantes issues de la même mère, facilitant la mesure de métriques de génétique quantitative, comme l'héritabilité par exemple. La deuxième précaution à prendre concerne ce qui a été appelé l'invisible fraction (Weis, 2018). L'idée est qu'il pourrait exister une différence entre la population « ressuscitée » et la population ancestrale lorsque le taux de germination n'est pas de 100%, la viabilité des graines diminuant durant la conservation. Les traits de la fraction de la population ne germant pas restent invisibles pour l'expérimentateur. En imaginant que certains traits sont liés à la durée de viabilité des graines, la distribution du trait mesuré dans la population ayant germé sera biaisée vers les valeurs favorables à une plus longue viabilité comparée à la distribution initiale du trait (Weis, 2018). La fraction invisible n'est donc un problème que si le trait est lié à la durée de viabilité et si le taux de germination observé en sortie de conservation est différent du taux de germination lors de la mise en conservation (Weis, 2018). Les données permettant de tester proprement ce biais sont rarement disponibles et les études ayant tenté de l'estimer sont peu nombreuses et peu représentatives des conditions de conservation (Franks et al., 2019).

IV.2 La pensée des champs (*Viola arvensis*) comme objet d'étude

La pensée des champs (*Viola arvensis*, Murray, 1770) est une espèce d'angiosperme sauvage proche des pensées cultivées, de la famille des Violacées. C'est une espèce diploïde ($2n = 34$), annuelle, adventice des cultures de blé et de colza notamment, que l'on retrouve également parfois en prairie (Scoppola and Lattanzi, 2012). Outre son nom, propice à de nombreux jeux de mots lors de la conception de ces travaux, la pensée des champs possède plusieurs caractéristiques qui font d'elle un objet d'étude intéressant pour l'évolution des systèmes de reproduction. Elle possède un système de reproduction mixte avec la capacité d'effectuer de l'autofécondation autonome, qui permet donc potentiellement l'évolution rapide du système de reproduction (Scoppola and Lattanzi, 2012 ; Cheptou et al., 2022). C'est une messicole, elle pousse dans les champs et les zones de grandes cultures, plus en proie au déclin des pollinisateurs, et est donc plus susceptible d'être exposée à un changement de régime de pollinisation (Goulson et al., 2015 ; Grab et al., 2019 ; Janousek et al., 2023). Cette sensibilité est renforcée par le fait qu'elle est plutôt pollinisée par des abeilles à longue langue, subissant un déclin plus sévère (Biesmeijer et al., 2006 ; Goulson et al., 2015 ; Drossart et al., 2019 ; Janousek et al., 2023). Elle a un temps de génération d'un an, se cultive relativement facilement en serre, présente de l'hétéromorphisme pollinique (Mignot et al., 1995 ; Scoppola and Magrini, 2019), et a montré des changements rapides de ses traits (Cheptou et al.,

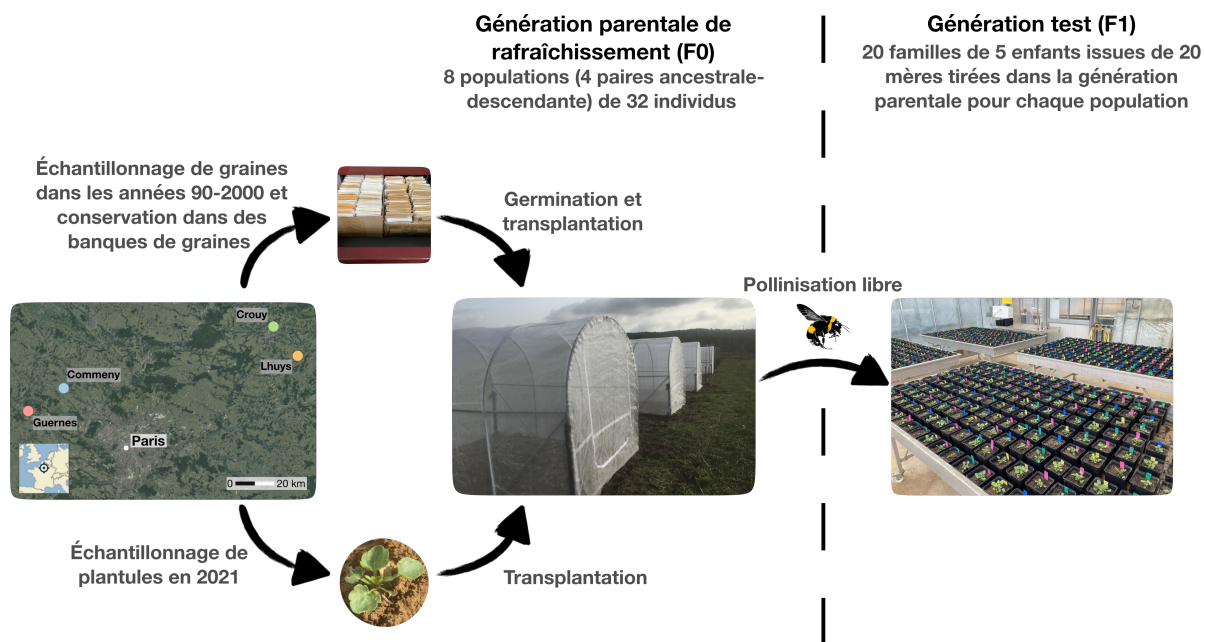


Figure 5 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental utilisé pour cette thèse

2022). Enfin, et c'est essentiel, des Conservatoires Botaniques Nationaux, ceux de Bailleul et du Bassin parisien, ont prélevé et conservé des graines de *Viola arvensis* dans les années 1990-2000.

Le matériel ayant permis de mener cette thèse est issu de quatre populations du nord du Bassin parisien échantillonnées deux fois. Le premier échantillonnage a été effectué et conservé par le Conservatoire Botanique National de Bailleul pour les populations de Lhuys (49°16'35.40"N, 3°32'58.52"E) et de Crouy (49°24'24.31"N, 3°22'20.73"E) en 1992 et 1993 respectivement, et par le Conservatoire Botanique National du Bassin parisien pour les populations de Guernes (49°1'10.75"N, 1°38'46.82"E) et de Commeny (49°7'37.11"N, 1°53'46.30"E) en 2000 et 2001 respectivement. Toutes ces populations ont été rééchantillonnées en Février 2021. Au total 8 populations, correspondant à quatre paires de populations ancestrale et descendante, ont été échantillonnées (Figure 5). Deux générations ont ensuite été cultivées à Montpellier. Une première de rafraîchissement avec 32 individus par population, chaque population étant confinée au sein d'une cage anti-insecte, a été menée sur le terrain de Baillarguet (43°40'53.92"N, 3°52'28.74"E) appartenant au Terrain d'Expériences, plateforme du LabEx CeMEB (Figure 5, génération F0). 20 mères par population ont été tirées aléatoirement pour donner, après pollinisation libre au sein de la population par des bourdons (*Bombus terrestris*), 20 familles de 5 enfants par population, soit 100 plantes par population. Cette seconde génération, la génération test, a été cultivée en serre sur le Terrain d'Expériences, au CEFE à Montpellier (Figure 5, génération F1). Tous les individus des deux générations ont été phénotypés pour un ensemble de traits et génotypés en utilisant onze microsatellites (Latron et al., 2018 ; Cheptou et al., 2022).

IV.3 Les objectifs de cette thèse

Le but de ce travail est de comprendre si le système de reproduction évolue rapidement, en réponse au probable déclin des pollinisateurs dans les milieux agricoles français, en prenant la pensée des

champs comme modèle. Le déclin des pollinisateurs est ici utilisé comme une expérience d'évolution du système de reproduction en conditions naturelles, expérience qui, bien qu'intéressante sur le plan théorique, met également en évidence des conséquences majeures de ce déclin sur la biodiversité en général, au-delà des seuls pollinisateurs.

Cette thèse s'articule selon trois grandes questions :

- Le système de reproduction a-t-il évolué vers l'autofécondation et le développement d'un syndrome d'autofécondation sur les dernières années et selon quel chemin ?
- Quelles sont les fonctions des différents traits associés au syndrome d'autofécondation en lien avec le système de reproduction ?
- Comment expliquer l'évolution de l'autofécondation et des différents traits constituant le syndrome d'autofécondation ?

Nous répondons à ces questions dans trois chapitres correspondants. Dans le premier chapitre, des analyses de la structure génétique des populations permettent d'estimer le taux d'autofécondation réalisé dans nos populations. Ces estimations sont combinées à la mesure de traits floraux *a priori* liés à l'interaction avec les pollinisateurs et à un test d'attractivité pour des bourdons (*Bombus terrestris*), afin de déterminer les patrons d'évolution entre les populations ancestrales et descendantes (**Manuscrit 1**). Cette description est complétée par la comparaison entre nos populations de traits floraux *a priori* aveugles pour les pollinisateurs comme le ratio pollen/ovule ou l'hétéromorphisme pollinique (**Manuscrit 2**). Dans le deuxième chapitre, l'analyse de parenté des individus de la deuxième génération, issus de la pollinisation libre de la première génération par des bourdons, jumelée à l'analyse des traits des parents, permet de relier les différents traits du syndrome d'autofécondation à leurs rôles pour la réalisation de l'autofécondation *via* les fonctions mâle et femelle, en lien ou non avec le comportement des pollinisateurs, et de manière dépendante ou non du contexte conspécifique (**Manuscrit 3**). Enfin dans le troisième chapitre, l'estimation de paramètres de génétique quantitative tels que l'héritabilité, la dépression de consanguinité ou encore l'intensité de sélection, grâce au design en famille et au génotypage des individus, permet de discuter les patrons d'évolution observés (**Manuscrit 4**).

Bibliographie

- T.-L. Ashman et C. J. Majetic (2006). Genetic constraints on floral evolution: a review and evaluation of patterns. *Heredity*, 96(5):343–352. doi: 10.1038/sj.hdy.6800815.
- S. C. H. Barrett (2002). The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, 3(4):274–284. doi: 10.1038/nrg776.
- S. C. H. Barrett (2010). Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1537):99–109. doi: 10.1098/rstb.2009.0199.
- G. Bell (1985). On the function of flowers. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 224(1235):223–265. doi: 10.1098/rspb.1985.0031.
- S. Benitez-Vieyra, A. M. Medina, E. Glinos et A. A. Cocucci (2006). Pollinator-mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated orchid. *Functional Ecology*, 20(6):948–957. doi: 10.1111/j.1365-2435.2006.01179.x.

- M. J. Benton, P. Wilf et H. Sauquet (2022). The Angiosperm Terrestrial Revolution and the origins of modern biodiversity. *New Phytologist*, 233(5):2017–2035. doi: 10.1111/nph.17822.
- J. C. Biesmeijer, S. P. M. Roberts, M. Reemer, R. Ohlemüller, M. Edwards, T. Peeters, A. P. Schaffers, S. G. Potts, R. Kleukers, C. D. Thomas, J. Settele et W. E. Kunin (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313(5785):351–354. doi: 10.1126/science.1127863.
- S. A. Bodbyl Roels et J. K. Kelly (2011). Rapid evolution caused by pollinator loss in *Mimulus guttatus*. *Evolution*, 65(9):2541–2552. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01326.x.
- S. Bory, M. Grisoni, M.-F. Duval et P. Besse (2008). Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(4):551–571. doi: 10.1007/s10722-007-9260-3.
- H. Breuninger et M. Lenhard (2010). Control of tissue and organ growth in plants. In *Plant Development*, pages 185–220. Elsevier, New York, USA. doi: 10.1016/S0070-2153(10)91007-7.
- R. Brys et H. Jacquemyn (2012). Effects of human-mediated pollinator impoverishment on floral traits and mating patterns in a short-lived herb: an experimental approach. *Functional Ecology*, 26(1):189–197. doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01923.x.
- J. W. Busch, S. Bodbyl Roels, S. Tusubira et J. K. Kelly (2022). Pollinator loss causes rapid adaptive evolution of selfing and dramatically reduces genome-wide genetic variability. *Evolution*, 76(9): 2130–2144. doi: 10.1111/evo.14572.
- D. R. Campbell (1989). Measurements of selection in a hermaphroditic plant: Variation in male and female pollination success. *Evolution*, 43(2):318–334. doi: 10.1111/j.1558-5646.1989.tb04230.x.
- J. C. F. Cardoso, M. L. Viana, R. Matias, M. T. Furtado, A. P. d. S. Caetano, H. Consolaro et V. L. G. d. Brito (2018). Towards a unified terminology for angiosperm reproductive systems. *Acta Botanica Brasiliica*, 32(3):329–348. doi: 10.1590/0102-33062018abb0124.
- D. Charlesworth et B. Charlesworth (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1):237–268. doi: 10.1146/annurev.es.18.110187.001321.
- E. L. Charnov (1982). The theory of sex allocation. *Monographs in Population Biology*, 18:1–355.
- P. O. Cheptou (2019). Does the evolution of self-fertilization rescue populations or increase the risk of extinction? *Annals of Botany*, 123(2):337–345. doi: 10.1093/aob/mcy144.
- P.-O. Cheptou, E. Imbert et M. Thomann (2022). Rapid evolution of selfing syndrome traits in *Viola arvensis* revealed by resurrection ecology. *American Journal of Botany*, 109(11):1838–1846. doi: 10.1002/ajb2.16028.
- C. C. Cockerham et B. S. Weir (1984). Covariances of relatives stemming from a population undergoing mixed self and random mating. *Biometrics*, 40(1):157. doi: 10.2307/2530754.
- J. F. Crow et M. Kimura (1970). *An introduction to population genetics theory*. Harper and Row, New York.
- R. W. Cruden (1977). Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31(1):32. doi: 10.2307/2407542.
- I. Dajoz, I. Till-Bottraud et P.-H. Gouyon (1991). Evolution of pollen morphology. *Science*, 253(5015): 66–68. doi: 10.1126/science.253.5015.66.
- I. Dajoz, I. Till-Bottraud et P.-H. Gouyon (1993). Pollen aperture polymorphism and gametophyte performance in *Viola diversifolia*. *Evolution*, 47(4):1080–1093. doi: 10.1111/j.1558-5646.1993.tb02137.x.
- C. Darwin (1859). *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. London.

- C. D. Darwin (1862). *On the various contrivances by which british and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing*. London.
- N. De Storme et D. Geelen (2014). The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms. *Plant, Cell & Environment*, 37(1):1–18. doi: 10.1111/pce.12142.
- L. F. Delph et T.-L. Ashman (2006). Trait selection in flowering plants: how does sexual selection contribute? *Integrative and Comparative Biology*, 46(4):465–472. doi: 10.1093/icb/icj038.
- T. G. Dobzhansky (1950). Evolution in the tropics. *American Scientist*, 38(2):208–221.
- M. Drossart, P. Rasmont, P. Vanormelingen, M. Dufrêne, M. Folschweiller, A. Pauly, N. Vereecken, S. Vray, E. Zambra, J. D’Haeseleer et D. Michez (2019). *Belgian Red List of Bees*. Presse universitaire de l’Université de Mons, Mons, Belgique.
- R. A. Fisher (1941). Average excess of average effect of a gene substitution. *Annals of Eugenics*, 11(1): 53–63. doi: 10.1111/j.1469-1809.1941.tb02272.x.
- J.-G. Fouché et L. Jouve (1999). *Vanilla planifolia*: history, botany and culture in Reunion island. *Agronomie*, 19(8):689–703. doi: 10.1051/agro:19990804.
- S. J. Franks, S. Sim et A. E. Weis (2007). Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4):1278–1282. doi: 10.1073/pnas.0608379104.
- S. J. Franks, E. Hamann et A. E. Weis (2018). Using the resurrection approach to understand contemporary evolution in changing environments. *Evolutionary Applications*, 11(1):17–28. doi: 10.1111/eva.12528.
- S. J. Franks, M. R. Sekor, S. Davey et A. E. Weis (2019). Artificial seed aging reveals the invisible fraction: implications for evolution experiments using the resurrection approach. *Evolutionary Ecology*, 33(6): 811–824. doi: 10.1007/s10682-019-10007-2.
- C. Galen (1989). Measuring pollinator-mediated selection on morphometric floral traits: bumblebees and the alpine sky plot *Polemonium viscosum*. *Evolution*, 43(4):882–890. doi: 10.1111/j.1558-5646.1989.tb05185.x.
- D. D. L. Gervasi et F. P. Schiestl (2017). Real-time divergent evolution in plants driven by pollinators. *Nature Communications*, 8(1):14691. doi: 10.1038/ncomms14691.
- S. Glémin, E. Bazin et D. Charlesworth (2006). Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1604): 3011–3019. doi: 10.1098/rspb.2006.3657.
- E. E. Goldberg et B. Igic (2008). On phylogenetic tests of irreversible evolution. *Evolution*, 62(11): 2727–2741. doi: 10.1111/j.1558-5646.2008.00505.x.
- E. E. Goldberg, J. R. Kohn, R. Lande, K. A. Robertson, S. A. Smith et B. Igic (2010). Species selection maintains self-incompatibility. *Science*, 330(6003):493–495. doi: 10.1126/science.1194513.
- C. Goodwillie, S. Kalisz et C. G. Eckert (2005). The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36(1):47–79. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.36.091704.175539.
- C. Goodwillie, R. D. Sargent, C. G. Eckert, E. Elle, M. A. Geber, M. O. Johnston, S. Kalisz, D. A. Moeller, R. H. Ree, M. Vallejo-Marin et A. A. Winn (2010). Correlated evolution of mating system and floral

- display traits in flowering plants and its implications for the distribution of mating system variation. *New Phytologist*, 185(1):311–321. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03043.x.
- D. Goulson, E. Nicholls, C. Botías et E. L. Rotheray (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229):1255957. doi: 10.1126/science.1255957.
- H. Grab, M. G. Branstetter, N. Amon, K. R. Urban-Mead, M. G. Park, J. Gibbs, E. J. Blitzer, K. Poveda, G. Loeb et B. N. Danforth (2019). Agriculturally dominated landscapes reduce bee phylogenetic diversity and pollination services. *Science*, 363(6424):282–284. doi: 10.1126/science.aat6016.
- C. A. Hallmann, M. Sorg, E. Jongejans, H. Siepel, N. Hofland, H. Schwan, W. Stenmans, A. Müller, H. Sumser, T. Hörrén, D. Goulson et H. de Kroon (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLOS ONE*, 12(10):e0185809. doi: 10.1371/journal.pone.0185809.
- D. M. Hansen, T. Van der Niet et S. D. Johnson (2012). Floral signposts: testing the significance of visual 'nectar guides' for pollinator behaviour and plant fitness. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1729):634–639. doi: 10.1098/rspb.2011.1349.
- L. D. Harder et M. A. Aizen (2010). Floral adaptation and diversification under pollen limitation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1539):529–543. doi: 10.1098/rstb.2009.0226.
- L. D. Harder et S. D. Johnson (2023). Beyond pollen:ovule ratios: Evolutionary consequences of pollinator dependence and pollination efficiency for pollen and ovule production in angiosperms. *American Journal of Botany*, 110(6):e16177. doi: 10.1002/ajb2.16177.
- M. Hartfield, T. Bataillon et S. Glémin (2017). The evolutionary interplay between adaptation and self-fertilization. *Trends in Genetics*, 33(6):420–431. doi: 10.1016/j.tig.2017.04.002.
- A. J. Helmstetter, R. Zenil-Ferguson, H. Sauquet, S. P. Otto, M. Méndez, M. Vallejo-Marín, J. Schönenberger, C. Burgarella, B. Anderson, H. de Boer, S. Glémin et J. Käfer (2023). Trait-dependent diversification in angiosperms: patterns, models and data. *Ecology Letters*, page ele.14170. doi: 10.1111/ele.14170.
- K. E. Holsinger (1991). Mass-action models of plant mating systems: the evolutionary stability of mixed mating systems. *The American Naturalist*, 138(3):606–622. doi: 10.1086/285237.
- B. Iqic et J. W. Busch (2013). Is self-fertilization an evolutionary dead end? *New Phytologist*, 198(2): 386–397. doi: 10.1111/nph.12182.
- B. Iqic et J. R. Kohn (2001). Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23):13167–13171. doi: 10.1073/pnas.231386798.
- B. Iqic et J. R. Kohn (2006). The distribution of plant mating systems: study bias against obligately outcrossing species. *Evolution*, 60(5):1098–1103. doi: 10.1111/j.0014-3820.2006.tb01186.x.
- B. Iqic, L. Bohs et J. R. Kohn (2004). Historical inferences from the self-incompatibility locus. *New Phytologist*, 161(1):97–105. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00952.x.
- B. Iqic, L. Bohs et J. R. Kohn (2006). Ancient polymorphism reveals unidirectional breeding system shifts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5):1359–1363. doi: 10.1073/pnas.0506283103.
- B. Iqic, R. Lande et J. Kohn (2008). Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *International Journal of Plant Sciences*, 169(1):93–104. doi: 10.1086/523362.
- W. M. Janousek, M. R. Douglas, S. Cannings, M. A. Clément, C. M. Delphia, J. G. Everett, R. G. Hatfield, D. A. Keinath, J. B. U. Koch, L. M. McCabe, J. M. Mola, J. E. Ogilvie, I. Rangwala, L. L. Richardson,

- A. T. Rohde, J. P. Strange, L. M. Tronstad et T. A. Graves (2023). Recent and future declines of a historically widespread pollinator linked to climate, land cover, and pesticides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(5):e2211223120. doi: 10.1073/pnas.2211223120.
- J. K. Kelly (1999). Response to selection in partially self-fertilizing populations. I. Selection on a single trait. *Evolution*, 53(2):336–349. doi: 10.1111/j.1558-5646.1999.tb03770.x.
- J. K. Kelly et H. S. Arathi (2003). Inbreeding and the genetic variance in floral traits of *Mimulus guttatus*. *Heredity*, 90(1):77–83. doi: 10.1038/sj.hdy.6800181.
- K.-i. Kubo, T. Entani, A. Takara, N. Wang, A. M. Fields, Z. Hua, M. Toyoda, S.-i. Kawashima, T. Ando, A. Isogai, T.-h. Kao et S. Takayama (2010). Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science*, 330(6005):796–799. doi: 10.1126/science.1195243.
- R. Lande et D. W. Schemske (1985). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution*, 39(1):24–40. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb04077.x.
- M. Latron, J.-F. Arnaud, H. Ferla, C. Godé et A. Duputié (2018). Polymorphic nuclear markers for coastal plant species with dynamic geographic distributions, the rock samphire (*Crithmum maritimum*) and the vulnerable dune pansy (*Viola tricolor subsp. curtisii*). *Molecular Biology Reports*, 45(3):203–209. doi: 10.1007/s11033-018-4153-4.
- E. Lavaut, M.-L. Guillemin, S. Colin, A. Faure, J. Coudret, C. Destombe et M. Valero (2022). Pollinators of the sea: a discovery of animal-mediated fertilization in seaweed. *Science*, 377(6605):528–530. doi: 10.1126/science.abo6661.
- D. G. Lloyd (1965). Evolution of self-compatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University*, (195):3–134.
- D. G. Lloyd (1992). Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, 153(3):370–380.
- D. G. Lloyd et D. J. Schoen (1992). Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences*, 153(3):358–369. doi: 10.1086/297040.
- W. P. Maddison, P. E. Midford et S. P. Otto (2007). Estimating a binary character's effect on speciation and extinction. *Systematic Biology*, 56(5):701–710. doi: 10.1080/10635150701607033.
- B. McCallum et S.-M. Chang (2016). Pollen competition in style: effects of pollen size on siring success in the hermaphroditic common morning glory, *Ipomoea purpurea*. *American Journal of Botany*, 103(3):460–470. doi: 10.3732/ajb.1500211.
- A. Mignot, I. Dajoz et I. Till-Bottraud (1995). Heteromorphism of pollen aperture number and heterogeneity at the tetrad stage in two *Viola* species and *Nicotiana tabacum*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, Série III-Sciences de la vie/Life sciences*, 318(4):453–457.
- E. Noël, P. Jarne, S. Glémin, A. MacKenzie, A. Segard, V. Sarda et P. David (2017). Experimental evidence for the negative effects of self-fertilization on the adaptive potential of populations. *Current Biology*, 27(2):237–242. doi: 10.1016/j.cub.2016.11.015.
- J. Ollerton, R. Winfree et S. Tarrant (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120(3):321–326. doi: 10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x.
- R. Ornduff (1969). Reproductive biology in relation to systematics. *TAXON*, 18(2):121–133. doi: 10.2307/1218671.

- H. Panique et C. M. Caruso (2020). Simulated pollinator declines intensify selection on floral traits that facilitate selfing and outcrossing in *Impatiens capensis*. *American Journal of Botany*, 107(1):148–154. doi: 10.1002/ajb2.1403.
- E. Porcher et R. Lande (2005). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression under pollen discounting and pollen limitation: pollination biology and evolution of selfing. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(3):497–508. doi: 10.1111/j.1420-9101.2005.00905.x.
- S. G. Potts, J. C. Biesmeijer, C. Kremen, P. Neumann, O. Schweiger et W. E. Kunin (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6):345–353. doi: 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- G. H. Pyke (1991). What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature*, 350(6313):58–59. doi: 10.1038/350058a0.
- A. R. Raduski, E. B. Haney et B. Igit (2012). The expression of self-incompatibility in Angiosperms is bimodal. *Evolution*, 66(4):1275–1283. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01505.x.
- C. Ritland et K. Ritland (1989). Variation of sex allocation among eight taxa of the *Mimulus guttatus* species complex (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, 76(12):1731–1739. doi: 10.1002/j.1537-2197.1989.tb15163.x.
- J. G. Rodger, J. M. Bennett, M. Razanajatovo, T. M. Knight, M. Van Kleunen, T.-L. Ashman, J. A. Steets, C. Hui, G. Arceo-Gómez, M. Burd, L. A. Burkle, J. H. Burns, W. Durka, L. Freitas, J. E. Kemp, J. Li, A. Pauw, J. C. Vamosi, M. Wolowski, J. Xia et A. G. Ellis (2021). Widespread vulnerability of flowering plant seed production to pollinator declines. *Science Advances*, 7(42):eabd3524. doi: 10.1126/sciadv.abd3524.
- S. Sallon, E. Solowey, Y. Cohen, R. Korchinsky, M. Egli, I. Woodhatch, O. Simchoni et M. Kislev (2008). Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science*, 320(5882):1464–1464. doi: 10.1126/science.1153600.
- H. Sauquet, M. Von Balthazar, S. Magallón, J. A. Doyle, P. K. Endress, E. J. Bailes, E. Barroso De Morais, K. Bull-Hereñu, L. Carrive, M. Chartier, G. Chomicki, M. Coiro, R. Cornette, J. H. L. El Ottra, C. Epicoco, C. S. P. Foster, F. Jabbour, A. Haevermans, T. Haevermans, R. Hernández, S. A. Little, S. Löfstrand, J. A. Luna, J. Massoni, S. Nadot, S. Pamperl, C. Prieu, E. Reyes, P. Dos Santos, K. M. Schoonderwoerd, S. Sontag, A. Soulebeau, Y. Staedler, G. F. Tschan, A. Wing-Sze Leung et J. Schönenberger (2017). The ancestral flower of angiosperms and its early diversification. *Nature Communications*, 8(1):16047. doi: 10.1038/ncomms16047.
- D. W. Schemske et R. Lande (1985). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution*, 39(1):41–52. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb04078.x.
- F. P. Schiestl, H. Kirk, L. Bigler, S. Cozzolino et G. A. Desurmont (2014). Herbivory and floral signaling: phenotypic plasticity and tradeoffs between reproduction and indirect defense. *New Phytologist*, 203(1):257–266. doi: 10.1111/nph.12783.
- D. J. Schoen (1982). The breeding system of *Gilia achilleifolia*: variation in floral characteristics and outcrossing rate. *Evolution*, 36(2):352. doi: 10.2307/2408054.
- D. J. Schoen, M. T. Morgan et T. Bataillon (1996). How does self-pollination evolve? Inferences from floral ecology and molecular genetic variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1345):1281–1290. doi: 10.1098/rstb.1996.0111.

- D. J. Schoen, M. O. Johnston, A.-M. L'Heureux et J. V. Marsolais (1997). Evolutionary history of the mating system in *Amsinckia* (Boraginaceae). *Evolution*, 51(4):1090–1099. doi: 10.1111/j.1558-5646.1997.tb03956.x.
- A. Scoppola et E. Lattanzi (2012). *Viola* section *Melanium* (Violaceae) in Italy. New data on morphology of *Viola tricolor*-Group. *Webbia*, 67(1):47–64. doi: 10.1080/00837792.2012.10670908.
- A. Scoppola et S. Magrini (2019). Comparative palynology and seed morphology in annual pansies (*Viola* sect. *Melanium*, Violaceae): implications for species delimitation. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153(6):883–899. doi: 10.1080/11263504.2019.1610113.
- A. Sicard et M. Lenhard (2011). The selfing syndrome: a model for studying the genetic and evolutionary basis of morphological adaptation in plants. *Annals of Botany*, 107(9):1433–1443. doi: 10.1093/aob/mcr023.
- A. Sicard, N. Stacey, K. Hermann, J. Dessoly, B. Neuffer, I. Bäurle et M. Lenhard (2011). Genetics, evolution, and adaptive significance of the selfing syndrome in the genus *Capsella*. *The Plant Cell*, 23(9):3156–3171. doi: 10.1105/tpc.111.088237.
- N. Sletvold, J. M. Grindeland et J. Ågren (2010). Pollinator-mediated selection on floral display, spur length and flowering phenology in the deceptive orchid *Dactylorhiza lapponica*. *New Phytologist*, 188(2):385–392. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03296.x.
- G. L. Stebbins (1957). Self fertilization and population variability in the higher plants. *The American Naturalist*, 91(861):337–354. doi: 10.1086/281999.
- R. E. Stephens, R. V. Gallagher, L. Dun, W. Cornwell et H. Sauquet (2023). Insect pollination for most of angiosperm evolutionary history. *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.18993.
- N. Takebayashi et P. L. Morrell (2001). Is self-fertilization an evolutionary dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and a macroevolutionary approach. *American Journal of Botany*, 88(7):1143–1150. doi: 10.2307/3558325.
- M. Thomann, E. Imbert, C. Devaux et P.-O. Cheptou (2013). Flowering plants under global pollinator decline. *Trends in Plant Science*, 18(7):353–359. doi: 10.1016/j.tplants.2013.04.002.
- M. Thomann, E. Imbert, R. C. Engstrand et P.-O. Cheptou (2015). Contemporary evolution of plant reproductive strategies under global change is revealed by stored seeds. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(4):766–778. doi: 10.1111/jeb.12603.
- I. Till-Bottraud, D. L. Venable, I. Dajoz et P.-H. Gouyon (1994). Selection on pollen morphology: a game theory model. *The American Naturalist*, 144(3):395–411. doi: 10.1086/285683.
- T. van der Niet et S. D. Johnson (2012). Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(6):353–361. doi: 10.1016/j.tree.2012.02.002.
- T. Van der Niet, R. Peakall et S. D. Johnson (2014). Pollinator-driven ecological speciation in plants: new evidence and future perspectives. *Annals of Botany*, 113(2):199–212. doi: 10.1093/aob/mct290.
- L. J. Weider, P. D. Jeyasingh et D. Frisch (2018). Evolutionary aspects of resurrection ecology: progress, scope, and applications-An overview. *Evolutionary Applications*, 11(1):3–10. doi: 10.1111/eva.12563.
- A. Weinbach, N. Loeuille et R. P. Rohr (2022). Eco-evolutionary dynamics further weakens mutualistic interaction and coexistence under population decline. *Evolutionary Ecology*, 36(3):373–387. doi: 10.1007/s10682-022-10176-7.
- A. E. Weis (2018). Detecting the "invisible fraction" bias in resurrection experiments. *Evolutionary Applications*, 11(1):88–95. doi: 10.1111/eva.12533.

- A. A. Winn, E. Elle, S. Kalisz, P.-O. Cheptou, C. G. Eckert, C. Goodwillie, M. O. Johnston, D. A. Moeller, R. H. Ree, R. D. Sargent et M. Vallejo-Marín (2011). Analysis of inbreeding depression in mixed-mating plants provides evidence for selective interference and stable mixed mating. *Evolution*, 65(12): 3339–3359. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01462.x.
- L. M. Wolfe et S. J. Mazer (2005). Patterns of phenotypic plasticity and their fitness consequences in wild radish (*Raphanus sativus*: Brassicaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 166(4):631–640. doi: 10.1086/430194.
- R. Zenil-Ferguson, J. G. Burleigh, W. A. Freyman, B. Igic, I. Mayrose et E. E. Goldberg (2019). Interaction among ploidy, breeding system and lineage diversification. *New Phytologist*, 224(3):1252–1265. doi: 10.1111/nph.16184.

RETOUR VERS LE PASSÉ : PATRONS D'ÉVOLUTION CONTEMPORAINE
DU SYSTÈME DE REPRODUCTION ET DES TRAITS ASSOCIÉS



MANUSCRIT

I

ÉVOLUTION CONTEMPORAINE ET CONVERGENTE D'UN SYNDROME
D'AUTOFÉCONDATION MENAÇANT LES INTERACTIONS PLANTES-POLLINISATEURS



Cet article a été publié dans *New Phytologist* et est accessible depuis le 19 Décembre 2023.



Ongoing convergent evolution of a selfing syndrome threatens plant-pollinator interactions

SAMSON ACOCA-PIDOLLE*, PERRINE GAUTHIER, LOUIS DEVRESSE, ANTOINE DEVERGE
MERDRIGNAC, VIRGINIE PONS, AND PIERRE-OLIVIER CHEPTOU

CEFE, Univ. Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

*Corresponding author, email address: samson.acoca-pidolle@cefe.cnrs.fr

Abstract

- Plant-pollinator interactions evolved early in the angiosperm radiation. Ongoing environmental changes are however leading to pollinator declines that may cause pollen limitation to plants and change the evolutionary pressures shaping plant mating systems.
- We used resurrection ecology methodology to contrast ancestors and contemporary descendants in four natural populations of the field pansy (*Viola arvensis*) in the Paris region (France), a depauperate pollinator environment. We combine population genetics analysis, phenotypic measurements and behavioural tests on a common garden experiment.
- Population genetics analysis reveals 27% increase in realized selfing rates in the field during this period. We documented trait evolution towards smaller and less conspicuous corollas, reduced nectar production and reduced attractiveness to bumblebees, with these trait shifts convergent across the four studied populations.
- We demonstrate the rapid evolution of a selfing syndrome in the four studied plant populations, associated with a weakening of the interactions with pollinators over the last three decades. This study demonstrates that plant mating systems can evolve rapidly in natural populations in the face of ongoing environmental changes. The rapid evolution towards a selfing syndrome may in turn further accelerate pollinator declines, in an eco-evolutionary feedback loop with broader implications to natural ecosystems.

Key words: Rapid evolution, mating system, selfing syndrome, plant-pollinator interactions, resurrection ecology, *Viola arvensis*

Introduction

The astonishing diversification of angiosperms, which started 100 million years ago (Benton et al., 2022), is commonly thought to have been stimulated and hastened by the diversity of plant-pollinator interactions (Whittall and Hodges, 2007). More than 80% of extant angiosperms rely on animals for pollination (Ollerton et al., 2011), thus plants and pollinators have a close relationship. Yet, previous studies have shown that a decline of pollinators (including bees, Anthophila) is ongoing across the world (Goulson et al., 2015; Hallmann et al., 2017; Grab et al., 2019). A lack of pollinators can in turn directly affect plant reproduction; indeed parallel declines in insect-pollinated plants and insects have been documented, over the last 50 years (Biesmeijer et al., 2006). At evolutionary time scales, pollen limitation has been shown to represent a major selective pressure in the evolution of self-fertilization (selfing) in theoretical evolutionary models (Lloyd, 1992; Thomann et al., 2013). In recent years, such a shift towards selfing has been experimentally reproduced in the absence of pollinators (Bodbyl Roels and Kelly, 2011; Gervasi and Schiestl, 2017; Ramos and Schiestl, 2019) and illustrated in natural populations impoverished in pollinators (Brys and Jacquemyn, 2012). This evolution of selfing is commonly associated with changes in reproductive traits such as a decrease in the distance between male and female organs (herkogamy; Bodbyl Roels and Kelly, 2011; Brys and Jacquemyn, 2012; Ramos and Schiestl, 2019) but also a decrease in floral traits mediating plant-pollinator interactions, such as a decrease in corolla and petal size, and decreased scent and nectar production (Brys and Jacquemyn, 2012; Gervasi and Schiestl, 2017; Ramos and Schiestl, 2019). A shift in mating system and traits leading to higher selfing, less conspicuous and attractive flowers has been well described at the species level (Stebbins, 1957; Sicard and Lenhard, 2011). This set of trait changes characterizes the evolution of a selfing syndrome (Ornduff, 1969; Sicard and Lenhard, 2011).

Faced with pollinator declines, natural populations are expected to evolve towards reduced plant-pollinator interactions and increased autonomous selfing (Thomann et al., 2013). However, demonstrating trait evolution requires distinguishing between the genetic and the environmental components of phenotypes, which is not straightforward in longitudinal studies of natural populations. The "resurrection ecology" approach, which involves growing dormant seeds collected from field populations multiple generations ago alongside their naturally occurring descendants (Franks et al., 2007; Weider et al., 2018), is a powerful methodology to detect such evolution (Weider et al., 2018). Indeed, this approach enables the contrast between traits of ancestral versus recent genotypes in a common environment, thus revealing the genetic components of temporal trait variation. Here, we took advantage of an ancestral seed collection of the field pansy (*Viola arvensis*) collected about two decades ago in the Paris region (France) to test whether this species' mating system has evolved in response to recent pollinator declines.

The study species is an annual weed of intensive crops (mostly wheat and oilseed rape) that produces only chasmogamous, zygomorphic, showy flowers and mixed selfing rates (Scoppola and Lattanzi, 2012; Cheptou et al., 2022). The length of the nectar spur and observations *in natura* are indicative of pollination by long-tongued bees. For example, *Bombus terrestris* is one of the wild pollinators observed. The study region has degraded pollination services compared with the rest of France (Martin et al., 2019). The status of pollinators or pollination services in such intensive agricultural areas has been reported as declining in several studies over our timescale (Goulson et al., 2015; Grab et al., 2019;

Potts et al., 2010; Burkle et al., 2013; Raven and Wagner, 2021; Janousek et al., 2023). Parts of Belgium (some 100 to 200 km north of our study area) have experienced similar agricultural dynamics as in our study region, and studies there indicate that 32.8% of bee species are threatened or extinct based on comparisons with their presence before and after 1970 (Drossart et al., 2019). These studies also highlighted a more severe decline or higher vulnerability of long-tongued bees (Biesmeijer et al., 2006; Goulson et al., 2015; Drossart et al., 2019; Janousek et al., 2023).

In this study, we contrast ancestors (collected in the 1990s to early 2000s) and contemporary descendants (collected in 2021) from four localities across a range of 100 kilometres in the study region, combining genetic and phenotypic approaches. After a refresher generation (F0), phenotypic traits were measured in the second generation (F1) in 2022 in an air-conditioned greenhouse. We quantified the evolution of traits mediating plant-pollinator interactions as well as other morphological traits not directly involved in plant-pollinator interactions. We also performed a pollinator preference experiment by monitoring bumblebee visitations in mixed artificial populations containing genotypes of the ancestral and descendant populations. Together, these approaches allowed us to document on the evolution of plant-pollinator interactions and evolution of plant mating system induced in recent environmental changes.

Material and methods

Study system and sampling

Viola arvensis Murray is an annual species of wild pansy (Violaceae). It is commonly found in fields as a weed or in meadows. This species is described as self-compatible with a mixed mating system (Scoppola and Lattanzi, 2012; Cheptou et al., 2022). Plants were sampled twice in agricultural fields in four locations of the Parisian Basin (**Table 1**). The first sampling was done and conserved by the Conservatoire Botanique National de Bailleul for Crouy (Cr) and Lhuys (Lh) in the 1990s and by the Conservatoire Botanique National du Bassin Parisien for Commeny (Co) and Guernes (Gu) in the 2000s. Seeds were collected by sampling fruits on a minimum of 100 mothers picked randomly in each population. The second sampling was performed in exactly the same locations, in an area that overlapped the ancestral sampling area as much as possible, in February 2021 by randomly sampling 40 or more seedlings. The minimal sampling areas was of 2,000 m² and corresponds to a case where all the population is circumscribed on this area. This sampling scheme produced four pairs, one for each

Table 1: Location and years of the sampling of the populations

<i>Location</i>	Commeny (49°7'37.11"N, 1°53'46.30"E)	Crouy (49°24'24.31"N, 3°22'20.73"E)	Guernes (49° 1'10.75", 1°38'46.82"E)	Lhuys (49°16'35.40"N, 3°32'58.52"E)
Year of first sampling (ancestors)	2001	1993	2000	1992
Year of second sampling (descendants)	2021	2021	2021	2021

location, of ancestral (A) and descendant (D) populations, thus eight populations in total.

Experimental design

To avoid maternal and potential storage effects (Franks et al., 2018), a refresher generation (F0) was grown in common garden with plants (A and D) originated from the field (**Figure 1**). As ancestral populations were stored seeds and descendant ones were collected at seedling stage in the field, common conditions for the F0 started at seedling stage. For ancestral populations, in mid-November 2020, seed lots were placed in germination chambers in petri dishes with vermiculite under light at 15°C for 12h and in the dark at 6°C for 12h. Germination rates were of 50% to 65%. 32 seedlings of ancestral and descendant populations were transplanted in late February 2021 in the field of the Baillarguet site of the experimental platform "Terrains d'Expériences" of the Labex Cemeb, 10 km north of Montpellier, France (43°40'53.92"N, 3°52'28.74"E). A single event of mortality was observed in CrD population. Populations were separated in insect-proof mesh cages (**Figure 1**). During full blooming, in mid-April, we introduced commercial bumblebee hives, Natupol from Koppert France® (Cavaillon, France), into the cages to produce open-pollinated fruits that we collected.

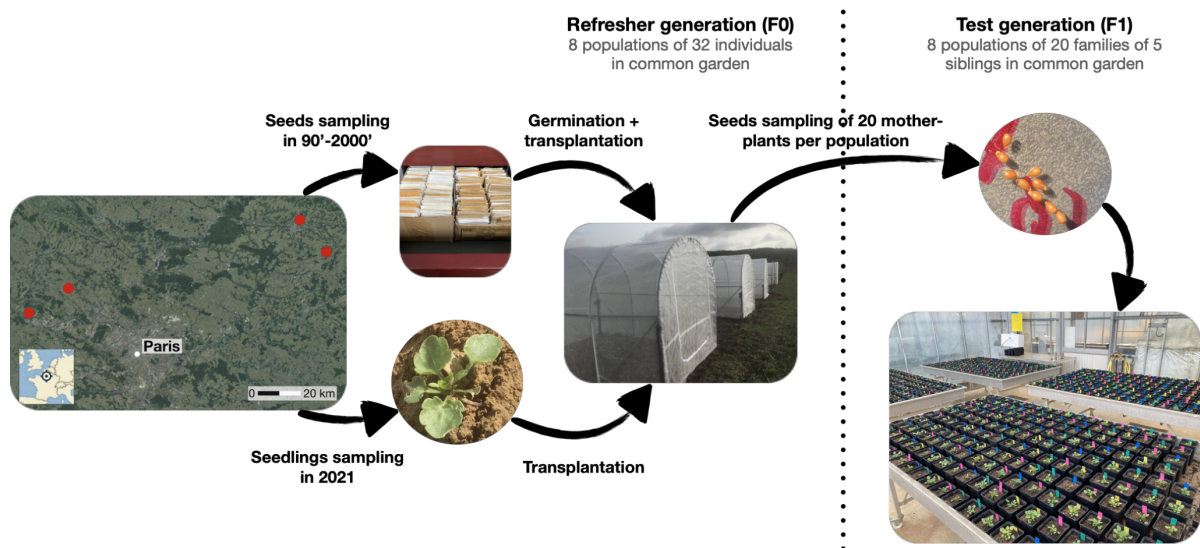


Figure 1: Experimental design

Four localities were sampled two times, with a minimum 20 years between the two samplings. The refresher generation (F0) was performed in common garden. It was used to analyse population genetics and to produce a family design of 20 families of 5 siblings per population for the test generation (F1), on which we measured traits.

These collected fruits produced by the refresher generation, in bumblebee pollination in common environment, were used for the experimental generation (F1). We randomly selected 20 mothers per population in the F0 generation to construct 20 families in the F1 generation. In December 2021, 30 seeds per family were placed in germination chambers in petri dishes with vermiculite under light at 15°C for 12h and in the dark at 6°C for 12h, to obtain enough plants for measurements. Germination rates per population range between 75% and 90%. In each family we selected five seedlings to establish families, each composed of five siblings (**Figure 1**). Three families did not germinate enough to obtain five plants and thus were composed of one, two or four siblings. Due to the high selfing ability of *Viola arvensis*,

most of the individuals were inbred, for both ancestors and descendants (confirmed by F1-individuals microsatellite genotyping, unpublished results). Plants were placed in individual pots ($11 \times 11 \times 11$ cm³) filled with standardized soil in late February and randomized in a greenhouse of the experimental platform "Terrains d'Expériences" of the Labex Cemeb, Montpellier, France. Watering was manual and done when needed. In total, 792 plants were followed during this experiment and no early mortality was observed. When all the morphological measurement were performed, plants were moved outside to complete their life cycle.

Population genetics

32 F0-plants per population were genotyped using eleven microsatellite markers, 6 designed for *Viola arvensis* (Cheptou et al., 2022) and 5 designed on *Viola tricolor* (Latron et al., 2018), a closely related species (Scoppola and Lattanzi, 2012). DNA was extracted from fresh leaves using Dneasy Plant Mini Kit from QIAGEN®. Analyses of metrics such as allelic richness, expected heterozygosity (H_e), using the R package GENEPOP (Rousset, 2008), were performed to look at a change in genetic diversity over time. A drastic decrease in allelic richness (or H_e) is indicative of genetic drift, strong population bottlenecks or a sampling bias. For the study species, a widespread weed, reduced population sizes can be ruled out because weed surveys have revealed higher occurrence in agrosystems in the study region (Fried and Reboud, 2007). Heterozygosity deficiency (F_{IS}) analyses were performed, using the R package HIERFSTATS (Goudet, 2005), on eleven microsatellite markers. F_{IS} was used to estimate the selfing rate using the following formula: $s_{F_{IS}} = \frac{2F_{IS}}{1+F_{IS}}$ (Crow and Kimura, 1970). This estimate of selfing integrates inbreeding over several generations which buffer annual effects. Confidence intervals were obtained by bootstraps of 32 individuals per population and calculation of F_{IS} (50,000 per population). Bootstraps allowed us to record differences between descendant and ancestral F_{IS} for each locality. The number of cases where the difference in reconstructed F_{IS} is inferior or equal to 0 divided by the number of bootstrap (50,000) gives us a P_{value} for H_0 : "True difference < 0 or True difference = 0". We performed a Fisher's combined probability test on the P_{values} obtained for each locality to test for a global increase in selfing rate between ancestral and descendant populations (Fisher, 1970). Because some P_{values} obtained were equal to 0, we had 1/50,000, the minimal P_{value} measurable by this method, to each P_{value} to compute the Fisher's combined probability test (conservative test).

Measurements of plant traits

Plant traits were measured on the test generation (F1). All the morphometric measurements were performed by a single experimenter during all the experimentation, to avoid any experimenter effect, using a digital caliper to 0.01 mm (Figure 2).

Corolla length, labellum width, spur length, sepal length, number of guides and anthesis duration were measured on the five first opened flowers of the main stem of each plant. We chose the first five opened flowers of the main stem because more exhaustive measurements in the F0 showed that they capture the floral variance of an individual. Measurements were made day+2 after anthesis, or day+3 when falling on weekends. The opening of flowers was followed every working day to assess the anthesis duration. Floral area approximation is the product of corolla length and labellum width. Sepal/corolla length ratio is the ratio of sepal to corolla lengths. Around 4,000 flowers were measured.

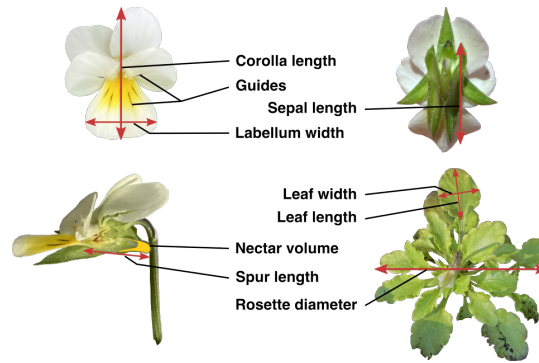


Figure 2: List of traits measured and delimitation of their measurements

Flowering date is the date of anthesis of the first flower of a plant. The number of flowers opened per plant was counted each working day, from the opening of the first flower, for one month and half, and two more times with one week and then two weeks delay between counts. This number was integrated using trapezoidal rule and divided by the duration between the flowering date of the plant and the last day of measurement, giving the average floral display. Nectar volume was collected and cumulated from three flowers per plant using $0.5 \mu\text{L}$ microcapillaries. It was measured randomly on individuals of the two populations of the same location simultaneously to avoid differences in nectar production caused by the time of measurement. Thus, for this measure, locality effect (see "Statistical analysis" below) is confounded with the day of measurement. It was measured on half of the plants from each population, representing all the families, thus 400 plants were sampled.

Vegetative traits such as rosette diameter, leaf length and leaf width were measured at the flowering date of the plant. Leaf length and leaf width were measured on the biggest leaf at this time, and the product of these two measures gives leaf area approximation. Biomass was measured on dried naturally dead plants at the end of their life cycle.

To measure production of seeds in absence and in presence of pollinators, when floral and leaf traits had been scored, youngest receptive flowers and oldest non-receptive ones on the same stem were marked before the exposition to pollinator to differentiate fruits produced in zero-pollinator context (self-pollination) versus fruits produced in open pollination. Thus, open pollination fruits were produced later in the stem. Then, plants were placed by groups of twenty in insect-proof mesh cages which contained commercial bumblebee (*Bombus terrestris*) hives, Natupol from Koppert France® (see "Bumblebee preference experiment" below). After 2 hours minimum (including the time for the bumblebee preference experiment), plants were moved outside in open pollination context. For each plant, just before the dehiscence of the marked fruit produced by self-pollination, we sampled the two fruits marked before (produced without or with exposition to pollinators) at the same time and recorded the difference in ranks of the fruits on the stem (minimum 1, by definition, to maximum 5, with a mean of 1.6). The sampling of the two fruits was performed at the same time because of the practical difficulty to follow 1,600 fruits independently. Thus, open pollination fruits are not fully developed and comparing weights between open pollination and self-pollination fruits is slightly biased. However, comparing each measure between populations is fully possible while differences in floral positions are distributed randomly between populations. Reproductive traits were obtained while counting and weighing all the seeds contained by fruit to the nearest 0.1 mg using a precision balance. The seed

weight reported is the measure of the weight of seeds contained in the fruit divided by the number of seeds counted in the fruit. The ratio of the number of seeds produced by self-pollination to the number of seeds produced by open pollination is a proxy of pollen limitation due to the absence of pollinators, the less this limitation is the more the self-pollination ability is.

Bumblebee preference experiment

Once all the floral trait measures have been made, F1-plants were exposed to commercial bumblebee (*Bombus terrestris*) hives, Natupol from Koppert France®, in two insect-proof mesh cages. In each insect-proof cage, we placed, for the entire experiment, a bumblebee hive of around 30 workers with a queen, with nutrient reserves. We randomly arranged plants from the same location in a group of 20 plants, composed of 10 plants from each ancestral and descendant population randomly selected in one of the two insect-proof cages. Pots were equally spaced at 35 cm. The observer, stationed in the entrance of the insect-proof cages, selected a foraging worker bumblebee, and recorded each flower visit during 10 to 15 minutes. Cage number (1, 2), position in the cage (1-20) and plant identities were also recorded. Experiments were performed between 2 May 2022 and 19 May 2022. We performed the experiment on 8 groups for each locality but just 6 and 7 observations were kept for Lhuys and Crouy respectively, because worker bumblebees foraged less than 10 minutes in the discarded observations. Of the 580 plants in our dataset, 3 are individuals exposed two times to reach the 20 individuals per observation. During a 10-15 minutes test, 4.28 plants were not visited on average and 124 in total for all the tests. In the analyses, we sorted out plants visited and unvisited (see below). We calculated the proportion of visits per plant as the ratio between the number of visits on a given plant divided by the total number of visits during a flight.

Statistical analysis

Changes in traits were evaluated using linear discriminant analysis (LDA) and univariate linear mixed models (LMMs). We performed the LDA over nine traits supposed to be linked with reproductive system; corolla length, labellum width, floral area, number of guides, anthesis duration, flowering date, volume of nectar, average floral display and ratio of seeds produced in self-pollination to open pollination. For traits with repeated measures, we used the means of traits per individual. We normalised values by locality in order to focus on age effect, *i.e.* ancestral or descendant. We predefined only the population (8 groups) in the LDA and not the age. LDA gives linear combinations of traits (discriminant functions) that attempt to capture differences among groups. In our case, it produced seven discriminant functions. The two first functions represent 55% and 22% of the variation.

Univariate analyses were conducted using LMMs with each trait as response variable, age (ancestral or descendant), locality (4 localities), and the interaction between age and locality as fixed factors, and family as random factor nested within the combination of age and locality. In order to account for repeated measures on the same individual for floral measurement, we add individual as random factor nested in family. For seeds traits, we accounted for the difference in flower position between the two fruits collected adding this difference as random factor nested in family. When there was significant age effect, analysis was followed by *T*-test comparison, on the means of the trait per individual for repeated measures, of ancestral and descendant populations of each locality. *T*-test *p*_{values} were corrected using

Bonferroni correction. Rosette diameter, leaf length, width and area, nectar volume and ratio of seeds without/with pollinators were log-transformed to approach normal distribution of residuals. In these analyses, age significant effect represents a signal of global evolution of traits between ancestral and descendant populations, locality significant effect, represents a difference in traits between localities. A significant effect of the interaction between age and locality represents a difference in the magnitude or in the sign of the evolution between localities. In the case of a significant age effect and a significant interaction effect, if evolution is consistent (same sign of evolution) among localities and only the magnitude change, we can hypothesise a directional selective force that selects a trait in a similar direction in every locality. In other cases, a significant interaction between age and locality indicates local differences in selective pressures on the trait, in genetic variance of the trait or alternatively genetic drift.

For bumblebee preference analyses, we first performed a GLMM to test the effect of age (ancestral or descendant) on the number of unvisited plants (unvisited plant proportions: CoA: 0.24, CoD: 0.35; CrA: 0.26, CrD: 0.26; GuA: 0.15, GuD: 0.18; LhA: 0.13, LhD: 0.12). We modelled it with age and locality as fixed effect, family, cage, position nested in cage and date as random effects, with binomial distribution and logit link, as response variable was a Boolean variable with TRUE for visited plants and FALSE otherwise. There was no significant effect of age in the probability of visit ($N = 580$ plants, estimates: Ancestral-Descendant = 0.223, $P = 0.296$). Thus, to avoid non-normal distribution, we excluded unvisited plants ($N = 124$) in the rest of the analysis (similar results were found when including or not unvisited plants). We performed a LMM with log-proportion of visits per plant as response variable ($N = 456$), and the same structure as for other traits with age, locality, and the interaction between age and locality as fixed effect, family as random effect and we added cage, position nested in cage and date as random effects. We then performed T -test comparisons between ancestors and descendants for given locality and corrected p_{values} using Bonferroni correction.

All our statistical analyses were performed using the R software (R Core Team, Version 4.2.1). LDA was performed using the "lda" function implemented in the package MASS (Venables and Ripley, 2002). LMMs and GLMM were performed using the "lmer" and "glmer" functions implemented in the package LME4 (Bates et al., 2015).

Results

The localities exhibited no overall significant differences in allelic richness, except a slight decrease in Commeny, nor genetic diversity between ancestral and descendant populations based on eleven microsatellite markers (Table 2). In the case of a resampling bias of the populations or a strong demographic bottleneck or genetic drift between the two samples, we predicted a decrease in allelic richness and genetic diversity. Our results do not support these scenarios. In contrast, we did observe a consistent increase in selfing rates in all localities between ancestral and descendant populations, except for Crouy (Table 2), with an average and significant increase of 27% (Fisher test, $\chi^2_8 = 45.81, P < 0.001$).

Descriptive multivariate analysis performed on eight floral traits associated with the mating system (corolla length, labellum width, floral area, number of guides, anthesis duration, flowering date, volume of nectar and average floral display) and the ability of plant to set seeds in the absence of pollinators (*i.e.* autonomous self-pollination), corrected for differences between localities, show differentiation between

Table 2: Allelic richness, genetic diversity and selfing rates in the populations (mean \pm SD or (95% CI) of *Viola arvensis*
 Average allelic richness and genetic diversity are based on 11 microsatellite markers. These markers were genotyped on the 32 individuals per population of the F0 generation issued from natural populations. For selfing rate, confidence intervals (CI) were obtained by bootstraps on individuals (50 000). Fisher's combined probability test gave a significant overall increase in F_{IS} ($\chi^2_8 = 45.81, P < 0.001$, see Materials and methods). The population first two letters are the name of the locality (Co = Commeny; Cr = Crouy; Gu = Guernes; Lh = Lhuys), "A" is for ancestral (collected in 2000 for Co, 1993 for Cr, 2001 for Gu and 1992 for Lh) and "D" for descendant (all collected in 2021).

Population	CoA	CrA	GuA	LhA
	CoD	CrD	GuD	LhD
Average allelic richness	2.55 \pm 1.21	3.09 \pm 1.81	2.64 \pm 1.29	2.82 \pm 1.78
	1.73 \pm 0.79	3.36 \pm 1.86	3.27 \pm 1.56	2.18 \pm 1.08
Genetic diversity (H_e)	0.302 \pm 0.272	0.436 \pm 0.264	0.314 \pm 0.210	0.315 \pm 0.291
	0.099 \pm 0.133	0.432 \pm 0.252	0.324 \pm 0.255	0.245 \pm 0.225
Selfing rate [95% CI] derived from heterozygosity deficiency, F_{IS}	0.74 [0.57-0.85]	0.66 [0.46-0.79]	0.44 [0.22-0.64]	0.33 [0.09-0.48]
	0.89 [0.66-1]	0.70 [0.55-0.80]	0.80 [0.71-0.88]	0.88 [0.78-0.95]

ancestral and descendant populations. We chose these traits because they are usually associated with shifts in mating systems (Sicard and Lenhard, 2011; Bodbyl Roels and Kelly, 2011; Gervasi and Schiestl, 2017; Ramos and Schiestl, 2019). The descendant populations and ancestral populations form two distinct clusters in the trait space (**Figure 3**), revealing convergent directional changes of floral traits in all four localities. Linear models on the nineteen traits measured revealed consistent patterns (**Table 3**). We detected a significant difference between ancestral and descendant populations for all the floral traits except sepal length (Table 3). Plants have evolved a 10% decrease in floral area (**Figure 3a**) through a combined decrease in the labellum width and flower length (**Table 3**). Flowers also have fewer nectar guides (**Figure 3b**). In contrast, none of the morphological traits presumed to be unlinked to pollinator attraction (vegetative traits and sepal length) showed consistent changes (**Figure 3c**, Table 3).

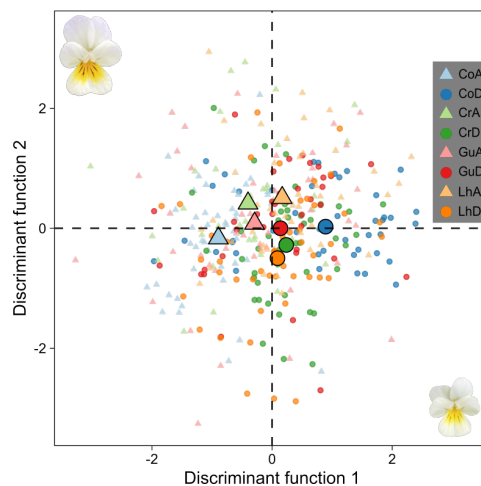


Figure 3: Multivariate differences between traits of ancestral and descendant populations of *Viola arvensis*
 Results of a multivariate analysis (linear discriminant analysis) performed on nine traits and 357 plants (almost equally distributed among groups; $N_{min} = 36$ individuals; 7 points not represented because out of scale). The first two functions represent 55% and 22% of the variation respectively. The population first two letters are the name of the locality (Co = Commeny; Cr = Crouy; Gu = Guernes; Lh = Lhuys), "A" (\blacktriangle) is for ancestral (collected in 2000 for Co, 1993 for Cr, 2001 for Gu and 1992 for Lh) and "D" (\bullet) for descendant (all collected in 2021). Enlarged symbols are centroids of groups.

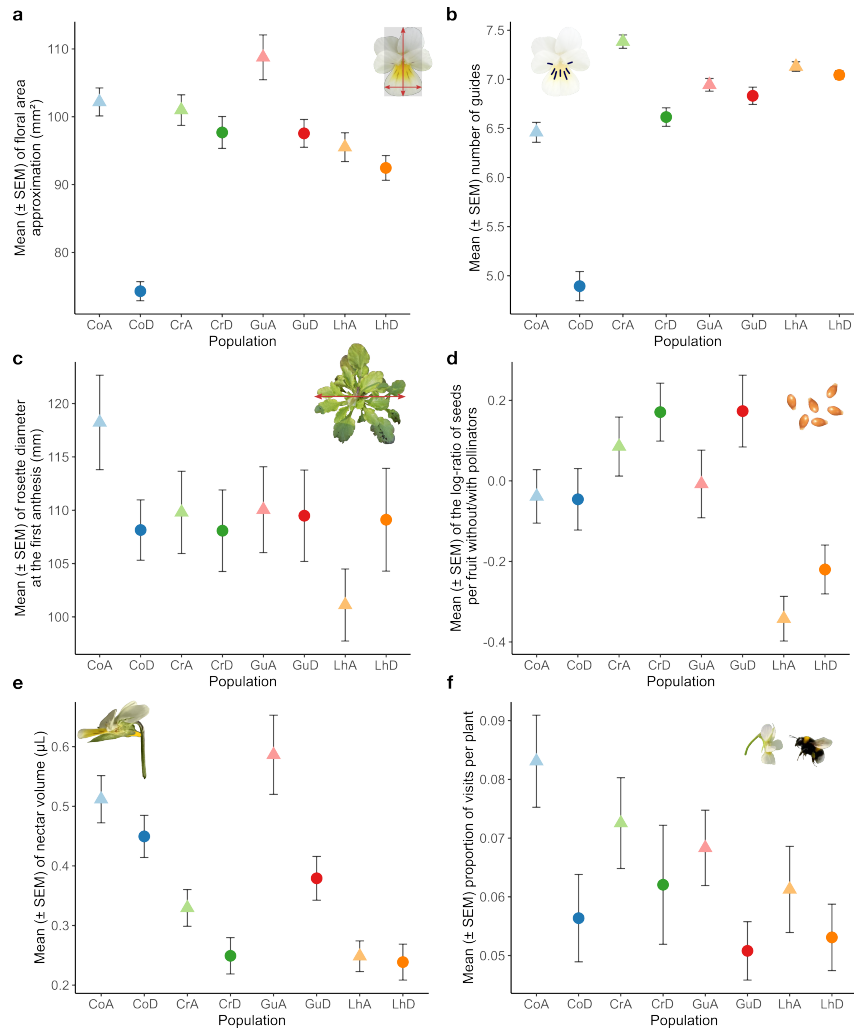


Figure 4: Evolutionary changes in floral, vegetative, reproductive and rewarding traits, and attractiveness of *Viola arvensis*
 We measured floral traits (a and b) in the first five developed flowers per individual ($N \approx 4,000$). (a) Floral area (multiplication of labellum width \times corolla length). (b) Number of nectar guides. (c) Rosette diameter, measured on each plant at the start of flowering ($N = 792$). (d) Log-ratio of seeds produced in self-pollination and one in open pollination compared to open pollination as a proxy of selfing ability, measured by collecting one fruit in self-pollination and one in open pollination per plant ($N = 693$). (e) Nectar production measured as the sum of the volume in three flowers per plants on fifty plants per population ($N = 400$). (f) Bumblebee preferences measured as proportion of visits per plant to a mixed plantation of 10 plants of the ancestral and 10 of the descendant populations of a single locality, exposed together to bumblebees. We recorded the number of visits to each plant by a flying bumblebee for 10 to 15 minutes in 6 to 8 replicates per location and divided it by the total number of visits during the flight (only visited plants are represented). The population first two letters are the name of the locality (Co = Commeny; Cr = Crouy; Gu = Guernes; Lh = Lhuys), "A" (\blacktriangle) is for ancestral (collected in 2000 for Co, 1993 for Cr, 2001 for Gu and 1992 for Lh) and "D" (\bullet) for descendant (all collected in 2021).

The increase in sepal/corolla ratios captures these uncorrelated changes between sepal and corolla (Table 3). Descendant plants or flowers are not globally smaller, they have smaller and less conspicuous corollas. Based on the resurrection approach, patterns of trait changes between ancestral and descendant populations provide a signature of mating system and associated trait evolution. Correlation among our traits reveals that there are two clusters of highly correlated traits, floral length, labellum width and the derived floral area, thus floral shape, and rosette diameter, leaf length, leaf width and the derived leaf area, thus leaf shape (Figure 5). This is why we discuss only one trait of these clusters in the following.

Table 3: Trait differences (mean \pm SD) among the four pairs of populations of *Viola arvensis*

Statistical analyses were performed using LMMs with age (ancestral or descendant), locality and the interaction between the two as fixed effects and family and, when necessary, other random effects were added (see Material and methods). When age effect was significant (bold traits), analyses were followed by two-side *T*-tests with a Bonferroni correction performed between the ancestral and descendant populations by locality. Significant differences in traits between ancestors and descendants ($P < 0.05$) was highlighted by bold measures and sign of changes are given using arrows (\nearrow for a decrease in time and \nwarrow for an increase in time). The population first two letters are the name of the locality (Co = Commeny; Cr = Crouy; Gu = Guermes; Lh = Lhuys). "A" is for ancestral (collected in 2000 for Co, 1993 for Cr, 2001 for Gu and 1992 for Lh) and "D" for descendant (all collected in 2021).

Trait	N	CoA Co21	CrA Cr21	GuA Gu21	LhA Lh21	Factor	Chisq	Chi df	P
Floral traits									
Corolla length (mm)	3955	14.03 \pm 1.09	13.28 \pm 1.45	14.06 \pm 2.18	13.23 \pm 1.47	Age	15.314	1	<0.001
		12.09 \pm 1.13	13.03 \pm 1.88	13.66 \pm 1.35	12.99 \pm 1.46	Locality	13.384	3	0.004
Labellum width (mm)	3955	7.16 \pm 0.94	7.45 \pm 0.99	7.51 \pm 1.16	7.04 \pm 0.76	Age \times Locality	16.638	3	<0.001
		6.03 \pm 0.59	7.30 \pm 0.92	7.01 \pm 0.88	6.94 \pm 0.67	Locality	17.872	1	<0.001
Floral area approximation (mm ²)	3955	102.2 \pm 19.9	101.0 \pm 22.5	108.8 \pm 33.1	95.5 \pm 21.2	Age \times Locality	30.047	3	<0.001
		74.3 \pm 14.0	97.7 \pm 23.5	97.6 \pm 20.5	92.5 \pm 18.2	Locality	14.725	3	0.002
Spur length (mm)	3954	4.25 \pm 0.22	4.30 \pm 0.24	4.30 \pm 0.28	4.37 \pm 0.19	Age \times Locality	17.965	1	<0.001
		4.00 \pm 0.23	4.27 \pm 0.27	4.23 \pm 0.31	4.38 \pm 0.23	Locality	17.979	3	<0.001
Sepal length (mm)	3955	13.92 \pm 1.32	14.26 \pm 1.51	12.64 \pm 1.34	13.61 \pm 1.19	Age \times Locality	14.989	3	0.002
		13.55 \pm 1.01	13.95 \pm 1.51	12.71 \pm 1.35	13.77 \pm 1.32	Age	8.373	1	0.004
Ratio sepal/corolla length	3955	0.998 \pm 0.078	1.088 \pm 0.117	0.918 \pm 0.120	1.044 \pm 0.102	Age \times Locality	42.226	3	<0.001
		1.132 \pm 0.099	1.093 \pm 0.125	0.941 \pm 0.107	1.077 \pm 0.083	Locality	12.388	3	0.006
Number of guides	3993	6.46 \pm 0.98	7.38 \pm 0.68	6.94 \pm 0.64	7.13 \pm 0.48	Age	63.509	1	0.459
		4.89 \pm 1.48	6.62 \pm 0.94	6.83 \pm 0.88	7.04 \pm 0.42	Locality	2.7607	3	<0.001
Anthesis duration (days)	3991	6.39 \pm 0.85	6.20 \pm 1.06	7.85 \pm 1.56	7.00 \pm 1.04	Age \times Locality	15.302	3	0.002
		5.07 \pm 0.85	6.07 \pm 0.91	7.27 \pm 1.29	7.41 \pm 0.81	Age	33.591	1	<0.001
Flowering date (day)	792	20.31 \pm 6.78	17.48 \pm 8.78	19.58 \pm 10.81	19.30 \pm 7.57	Age \times Locality	112.889	3	<0.001
		18.54 \pm 4.58	17.57 \pm 7.82	20.23 \pm 12.69	19.69 \pm 9.13	Locality	30.675	3	<0.001
Average floral display (open flowers per day)	789	6.37 \pm 2.39	6.85 \pm 2.59	7.89 \pm 3.47	6.64 \pm 2.31	Age	9.261	1	0.002
		4.64 \pm 1.99	6.89 \pm 2.87	6.95 \pm 3.26	6.43 \pm 2.17	Age \times Locality	137.555	3	<0.001
						Age \times Locality	24.407	3	<0.001
						Age	0.027	1	0.870
						Locality	3.783	3	0.286
						Age \times Locality	1.007	3	0.800
						Age	8.190	1	0.004
						Locality	32.182	3	<0.001
						Age \times Locality	7.855	3	0.049

Vegetative traits									
Rosette diameter (mm)	792	118.23 ± 42.75 108.15 ± 28.11	109.80 ± 38.60 108.08 ± 38.24	110.05 ± 40.29 109.49 ± 42.85	101.12 ± 33.77 109.11 ± 48.21	Age Locality Age × Locality	0.194 5.601 2.397	1 3 3	0.660 0.133 0.494
Leaf length (mm)	792	26.30 ± 6.38 22.42 ± 3.95	24.10 ± 5.63 24.28 ± 5.65	22.34 ± 5.18 23.17 ± 6.07	21.57 ± 4.85 21.94 ± 5.63	Age Locality Age × Locality	1.226 19.895 11.311	1 3 3	0.268 <0.001 0.010
Leaf width (mm)	792	19.84 ± 3.77 17.96 ± 2.56	18.67 ± 3.03 18.94 ± 3.01	17.02 ± 2.76 16.66 ± 2.91	17.58 ± 3.07 17.66 ± 3.07	Age Locality Age × Locality	2.499 40.014 8.024	1 3 3	0.114 <0.001 0.046
Leaf area approximation (mm ²)	792	541.3 ± 231.9 410.5 ± 128.7	461.3 ± 173.6 472.4 ± 177.6	391.3 ± 152.8 398.5 ± 173.7	390.2 ± 147.1 401.6 ± 173.0	Age Locality Age × Locality	1.910 27.414 10.559	1 3 3	0.167 <0.001 0.014
Biomass (g)	777	7.243 ± 2.515 8.034 ± 2.553	8.220 ± 2.712 7.789 ± 2.747	8.027 ± 2.624 7.606 ± 2.904	8.090 ± 2.901 8.386 ± 3.066	Age Locality Age × Locality	0.029 3.490 4.850	1 3 3	0.864 0.322 0.183
Reproductive traits									
Log-ratio of the number of seeds without/with pollinators	693	-0.0389 ± 0.619 -0.046 ± 0.711	0.085 ± 0.659 0.169 ± 0.687	-0.008 ± 0.775 0.173 ± 0.757	-0.342 ± 0.546 -0.220 ± 0.601	Age Locality Age × Locality	3.201 38.344 1.671	1 3 3	0.074 <0.001 0.643
Weight per seed with pollinators (mg)	656	0.446 ± 0.199 0.385 ± 0.161	0.421 ± 0.153 0.369 ± 0.146	0.301 ± 0.154 0.300 ± 0.143	0.541 ± 0.146 0.546 ± 0.142	Age Locality Age × Locality	4.744 212.885 5.999	1 3 3	0.029 <0.001 0.112
Weight per seed without pollinators (mg)	701	0.689 ± 0.206 0.565 ± 0.200	0.633 ± 0.169 0.585 ± 0.164	0.517 ± 0.187 0.501 ± 0.189	0.764 ± 0.137 0.788 ± 0.117	Age Locality Age × Locality	9.3644 226.2555 18.3624	1 3 3	0.002 <0.001 <0.001
Plant-pollinator interaction traits									
Nectar volume (µL)	400	0.512 ± 0.280 0.450 ± 0.251	0.330 ± 0.218 0.249 ± 0.215	0.586 ± 0.470 0.379 ± 0.260	0.248 ± 0.182 0.239 ± 0.213	Age Locality Age × Locality	12.605 75.120 4.636	1 3 3	<0.001 <0.001 0.200
Bumblebee visit preferences (proportion of visit per plant)	456	0.083 ± 0.008 0.056 ± 0.007	0.073 ± 0.008 0.062 ± 0.010	0.068 ± 0.006 0.051 ± 0.005	0.061 ± 0.007 0.053 ± 0.006	Age Locality Age × Locality	14.722 2.027 1.950	1 3 3	<0.001 0.567 0.583

Regarding reproductive traits, our results revealed a marginally significant ($\chi^2_1 = 3.257, P = 0.071$) increase over time in the ability to set seeds in the absence of pollinators (**Figure 3d**). The log-ratio can be greater than zero because fruits higher in the stem, open pollinated fruits in our experimental design, produce less seeds, independently to pollinators. However, we found a significant decrease in seed weight in open- and self-pollination (**Table 3**).

Our study also reveals that both locality and the interaction between locality and age (ancestors or descendants) have a strong effect on trait variations. The locality effects indicate spatial differentiation in measured traits, whereas the locality \times age interaction reveals a site dependent evolution. The latter interaction effects were different in magnitude, but not in sign, between ancestors and descendants for all the traits, except anthesis duration (**Table 3**). Hence, evolution in the four localities exhibits the same directional change *i.e.* evidence of convergent shifts towards a selfing syndrome in the four independent populations (**Figure 3**) while differing in magnitude.

We found a consistent decrease of 20% on average in rewarding traits, as represented by measurements of nectar volume (**Figure 3e, Table 3**).

We assessed how this evolution impacts plant-pollinator interactions from the point of view of pollinators through a preference experiment involving visits of the bumblebees (*Bombus terrestris*) to a mixture of ancestral and descendant plants. Bumblebees visited ancestral plants more frequently than they visited descendant plants, showing a preference towards the former that is consistent with their higher attractiveness and reward traits (**Figure 3f, Table 3**).

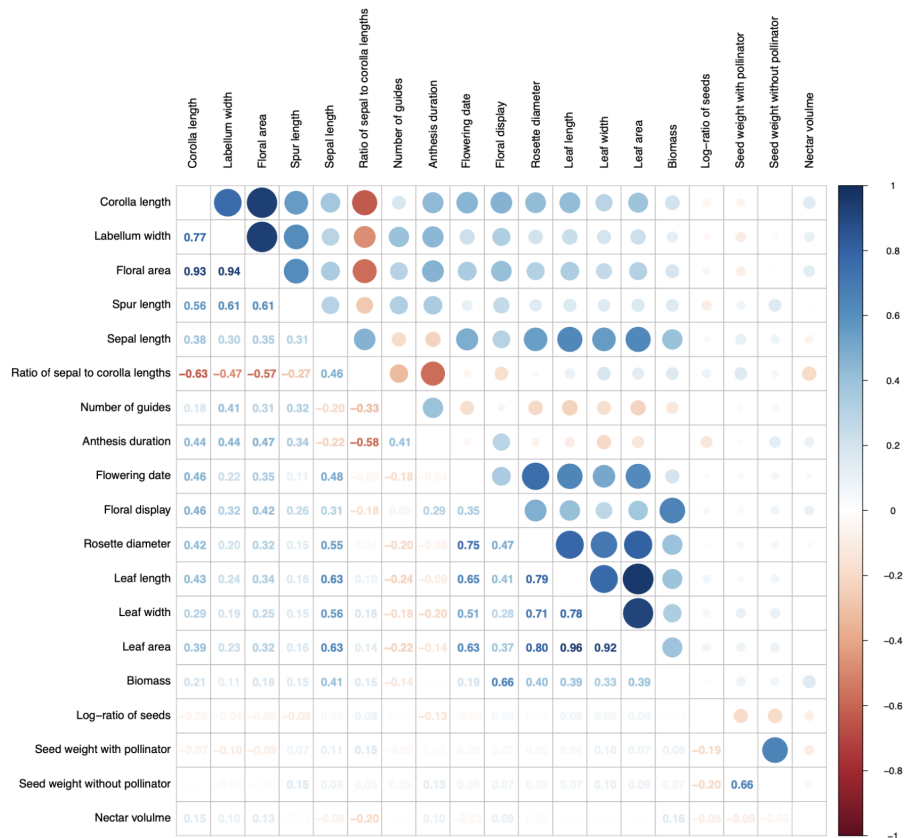


Figure 5: Correlation between measured traits presented in Table 3

Discussion

Overall, we found decreases in plant-insect mediating traits such as floral display, floral area, nectar guides, which are assumed to promote recognition of the path to floral rewards (Hansen et al., 2012), and nectar production. The lack of consistent changes in vegetative traits, except for leaf traits in Commeny which could be explained by the earlier flowering (**Figure 5**), leads us to conclude that changes observed are not due to inbreeding depression, especially because late acting traits such as biomass exhibit no changes (Winn et al., 2011). Moreover, in an additional experiment, we have measured a very low inbreeding depression on floral traits (around 3%). Such a value, far below the observed trait shift, cannot account for the observed shift (*in prep.*). Changes in sepal to corolla length ratio but not in sepal length (**Table 3**) point out evidence of differential evolution of petal and sepal lengths despite their homologous origins (Breuning and Lenhard, 2010). This provides strong evidence for selection against specific alleles coding costly traits that mediate interactions with pollinators.

Decreases in plant-insect mediating traits (*e.g.*, floral area, nectar production) are well accompanied by decreases in floral attractiveness, as well as an increase in selfing rates. This is also accompanied by an evidence for enhanced selfing ability, except for Commeny and Crouy in agreement with the lack of significantly increased selfing rate. Decrease in seed weight, characterizing maternal investment in individual progeny, is consistent with a shift towards increased reproductive assurance associated with reduced seed investment, as observed in previous studies (De Jong et al., 2005). These changes are all consistent with the ongoing evolution of a selfing syndrome (Ornduff, 1969; Sicard and Lenhard, 2011). Furthermore, we found such patterns to be convergent across the four populations investigated (**Figure 3**), despite changes in magnitude. Such changes in magnitude can be due to genetic drift, differences in genetic variances for the traits or differences in selective pressures among localities.

The absence of significant change in selfing ability and selfing rate in Commeny despite the highest change in floral traits could be explained by an earlier evolution toward selfing than in other populations. Indeed, we only capture a small part of the evolution trajectory toward selfing syndrome. We may suppose that traits directly linked to selfing (herkogamy or dichogamy for example) evolved earlier than traits mediating plant-pollinator interaction, linked to investment in outcrossing (this pattern is also observed in Bodbyl Roels and Kelly, 2011). Following this hypothesis, evolution of traits mediating plant-pollinator interaction is secondary and driven by the release of the selective pressure imposed by pollinators, the cost of maintenance of traits and potential reallocations. In this case, selfing ability or selfing rate could have already evolved in ancestral population (pollinator decline has been recorded since 1970, Biesmeijer et al., 2006), resulting in slight changes between our two samples (**Figure 3d**, **Table 2**). With increased selfing, floral traits linked to investment in outcrossing are just costs which can experience large changes (**Figure 3a-b**). Earlier evolution is consistent with the fact that the ancestral population of Commeny had the highest selfing rate of ancestral populations (**Table 2**).

In spite of these local differences, this study thus provides a unique demonstration for a convergent evolutionary change in plant mating systems over a short-time scale in natural populations. Indeed, despite similar floral trait evolutions were found in a single population of *Volia arvensis* in another French intensive agricultural area (Cheptou et al., 2022), this study is the first to show convergent evolution across populations, reduced rewarding trait, and reduced attractiveness.

The decrease in nectar production in our study species provides evidence of a reduced interaction

between plants and their pollinators. Indeed, floral nectar production is costly (Pyke, 1991) and only dedicated to rewarding pollinators, thus is key to the maintenance of stable plant-pollinator interactions (Brandenburg et al., 2012). While angiosperm-pollinator interactions have evolved over the long-term, our study shows that current environmental changes can drive a rapid evolution towards a breakdown of such interactions.

Recurrent evolution towards selfing has been repeatedly documented in the wild, but to our knowledge, only at the phylogenetic time scale (Stebbins, 1957; Barrett, 2002). This evolutionary transition is classically considered to be irreversible (the "selfing as an evolutionary dead-end" hypothesis, Stebbins, 1957; Iqic and Busch, 2013) and higher extinction rates of such lineages have been reported (Goldberg et al., 2010). Evolution towards selfing could thus be driven by natural selection over the short-term but could impede long-term plant population survival (Cheptou, 2019). The increase in selfing rate is indeed expected to have genomic impacts on individuals and populations through inbreeding (homozygosity), reduced effective population sizes and increased genetic drift (Busch et al., 2022). Although our results do not support this, it is interesting to note that the only location showing reduced genetic richness, Commeny, is also the one showing the most pronounced change in morphology and thus experienced the more pronounced selection. This reduction of genetic richness could be the product of drift and of the interaction of inbreeding and selection (genetic draft, Busch et al., 2022). The absence of reduction in genetic diversity in other locations could be due to large enough population size and thus very limited effect of genetic drift or recent increase in inbreeding consistent with low morphology differentiation. However, linked to a decreased genetic diversity, selfer populations may have a reduced potential response to future selective pressures (Glémin and Ronfort, 2013; Noël et al., 2017). The short-term evolution of selfing in *Viola arvensis* we document here is no-doubt facilitated by its initial mixed mating system (contrary to self-incompatible plants for example, Thomann et al., 2015). Nonetheless our results illustrate how mixed-mating species may evolve towards a higher reliance on self-pollination and reduced plant-pollinator interactions in the face of global change, in particular pollinator declines. If this rapid transition towards a selfing syndrome reflects a broader trend among Angiosperms, it may reflect a concerning extinction debt (Goldberg et al., 2010).

Ongoing environmental changes – such as habitat destruction and fragmentation, agricultural land pollution and species' introductions – have been documented as causes of pollinator declines, both by affecting pollinator populations directly (Potts et al., 2010; Goulson et al., 2015), and indirectly through their impacts on plant community composition, affecting the quantity and diversity of nectar resources (Goulson et al., 2015; Baude et al., 2016). In addition, and as we illustrate here, floral nectar production can also evolve rapidly in plant species in response to a relaxed selective pressure associated with pollinator declines, prompting declines in nectar resources of a magnitude similar to those associated with changes in plant community composition (Baude et al., 2016). These decreases in nectar production may then reinforce pollinator declines if nectar levels fall below those necessary to sustain wild bee populations. Environmental changes may thus present a double jeopardy to pollinator populations, as they become victims of both the changes themselves and of plant trait evolution (Weinbach et al., 2022). This in turn may result in an eco-evolutionary positive feedback loop that furthers pollinator declines, further reinforcing plant evolution towards a selfing syndrome. This can explain plant-pollinator network degradation as documented in a previous study (Burkle et al., 2013) and raises the concerning prospect of cascading effects in trophic networks in general, beyond plant-pollinator interactions.

In summary, our study highlights the potential of natural populations to respond quickly to environmental changes. However, such evolutionary responses may have impacts on ecological interactions, here plant-pollinator interactions, and potentially cascading trophic consequences in ecosystems. There is thus an urgent need to investigate whether these results are symptomatic of a broader pattern among angiosperms and their pollinators, and if so understanding whether there is a possibility to reverse this process and break this eco-evolutionary positive feedback loop.

Acknowledgments

We thank David Delguerde for construction and installation of insect-proof cages, Pauline Durbin and Fabien Lopez for help in taking care of the plants during the experiment, Marie-Pierre Dubois for lab-work guidance, the Conservatoire Botanique National de Bailleul and the Conservatoire Botanique National du Bassin Parisien for the supply of seeds and information on sampling locations, Anaïs Vignerol for help in data collection, Ana Rodrigues, John D. Thompson, Pierre-André Crochet and three anonymous reviewers for improving this manuscript. Genotyping data was obtained using technical facilities of GenSeq of the "Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier" with the support of LabEx CeMEB an ANR "Investissements d'avenir" program (ANR-10-LABX-04-01).

Competing interests

Authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

Conceptualization: POC, SAP; methodology: SAP, POC; lab work: LD, SAP; data collection: SAP, PG, ADM, VP, POC; analysis: SAP, LD; writing – original draft: SAP; writing – review & editing: SAP, POC

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available in [data.InDoRES](#).

References

- S. C. H. Barrett (2002). The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, 3(4):274–284. doi: 10.1038/nrg776.
- D. Bates, M. Mächler, B. Bolker et S. Walker (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1):1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01.
- M. Baude, W. E. Kunin, N. D. Boatman, S. Conyers, N. Davies, M. A. K. Gillespie, R. D. Morton, S. M. Smart et J. Memmott (2016). Historical nectar assessment reveals the fall and rise of floral resources in Britain. *Nature*, 530(7588):85–88. doi: 10.1038/nature16532.
- M. J. Benton, P. Wilf et H. Sauquet (2022). The Angiosperm Terrestrial Revolution and the origins of modern biodiversity. *New Phytologist*, 233(5):2017–2035. doi: 10.1111/nph.17822.

- J. C. Biesmeijer, S. P. M. Roberts, M. Reemer, R. Ohlemüller, M. Edwards, T. Peeters, A. P. Schaffers, S. G. Potts, R. Kleukers, C. D. Thomas, J. Settele et W. E. Kunin (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313(5785):351–354. doi: 10.1126/science.1127863.
- S. A. Bodbyl Roels et J. K. Kelly (2011). Rapid evolution caused by pollinator loss in *Mimulus guttatus*. *Evolution*, 65(9):2541–2552. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01326.x.
- A. Brandenburg, C. Kuhlemeier et R. Bshary (2012). Hawkmoth pollinators decrease seed set of a low-nectar *Petunia axillaris* line through reduced probing time. *Current Biology*, 22(17):1635–1639. doi: 10.1016/j.cub.2012.06.058.
- H. Breuninger et M. Lenhard (2010). Control of tissue and organ growth in plants. In *Plant Development*, pages 185–220. Elsevier, New York, USA. doi: 10.1016/S0070-2153(10)91007-7.
- R. Brys et H. Jacquemyn (2012). Effects of human-mediated pollinator impoverishment on floral traits and mating patterns in a short-lived herb: an experimental approach. *Functional Ecology*, 26(1):189–197. doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01923.x.
- L. A. Burkle, J. C. Marlin et T. M. Knight (2013). Plant-pollinator interactions over 120 years: loss of species, co-occurrence, and function. *Science*, 339(6127):1611–1615. doi: 10.1126/science.1232728.
- J. W. Busch, S. Bodbyl Roels, S. Tusubira et J. K. Kelly (2022). Pollinator loss causes rapid adaptive evolution of selfing and dramatically reduces genome-wide genetic variability. *Evolution*, 76(9): 2130–2144. doi: 10.1111/evo.14572.
- P. O. Cheptou (2019). Does the evolution of self-fertilization rescue populations or increase the risk of extinction? *Annals of Botany*, 123(2):337–345. doi: 10.1093/aob/mcy144.
- P.-O. Cheptou, E. Imbert et M. Thomann (2022). Rapid evolution of selfing syndrome traits in *Viola arvensis* revealed by resurrection ecology. *American Journal of Botany*, 109(11):1838–1846. doi: 10.1002/ajb2.16028.
- J. F. Crow et M. Kimura (1970). *An introduction to population genetics theory*. Harper and Row, New York.
- T. J. De Jong, H. Van Dijk et P. G. L. Klinkhamer (2005). Hamilton's rule, imprinting and parent-offspring conflict over seed mass in partially selfing plants: parent-offspring conflict over seed mass. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(3):676–682. doi: 10.1111/j.1420-9101.2004.00856.x.
- M. Drossart, P. Rasmont, P. Vanormelingen, M. Dufrêne, M. Folschweiller, A. Pauly, N. Vereecken, S. Vray, E. Zambra, J. D'Haeseleer et D. Michez (2019). *Belgian Red List of Bees*. Presse universitaire de l'Université de Mons, Mons, Belgique.
- R. A. Fisher (1970). *Statistical Methods for Research Workers*. Hafner Publishing Company, Darien, USA, 14th ed., rev. and enl edition.
- S. J. Franks, S. Sim et A. E. Weis (2007). Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4):1278–1282. doi: 10.1073/pnas.0608379104.
- S. J. Franks, E. Hamann et A. E. Weis (2018). Using the resurrection approach to understand contemporary evolution in changing environments. *Evolutionary Applications*, 11(1):17–28. doi: 10.1111/eva.12528.
- G. Fried et X. Reboud (2007). Évolution de la composition des communautés adventices des cultures de colza sous l'influence des systèmes de culture. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 14(2):130–138. doi: 10.1051/ocl.2007.0098.

- D. D. L. Gervasi et F. P. Schiestl (2017). Real-time divergent evolution in plants driven by pollinators. *Nature Communications*, 8(1):14691. doi: 10.1038/ncomms14691.
- S. Glémin et J. Ronfort (2013). Adaptation and maladaptation in selfing and outcrossing species: new mutations versus standing variation. *Evolution*, 67(1):225–240. doi: 10.1111/j.1558-5646.2012.01778.x.
- E. E. Goldberg, J. R. Kohn, R. Lande, K. A. Robertson, S. A. Smith et B. Igc (2010). Species selection maintains self-incompatibility. *Science*, 330(6003):493–495. doi: 10.1126/science.1194513.
- J. Goudet (2005). HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical *F*-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5(1):184–186. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00828.x.
- D. Goulson, E. Nicholls, C. Botías et E. L. Rotheray (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229):1255957. doi: 10.1126/science.1255957.
- H. Grab, M. G. Branstetter, N. Amon, K. R. Urban-Mead, M. G. Park, J. Gibbs, E. J. Blitzer, K. Poveda, G. Loeb et B. N. Danforth (2019). Agriculturally dominated landscapes reduce bee phylogenetic diversity and pollination services. *Science*, 363(6424):282–284. doi: 10.1126/science.aat6016.
- C. A. Hallmann, M. Sorg, E. Jongejans, H. Siepel, N. Hofland, H. Schwan, W. Stenmans, A. Müller, H. Sumser, T. Hörren, D. Goulson et H. de Kroon (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLOS ONE*, 12(10):e0185809. doi: 10.1371/journal.pone.0185809.
- D. M. Hansen, T. Van der Niet et S. D. Johnson (2012). Floral signposts: testing the significance of visual 'nectar guides' for pollinator behaviour and plant fitness. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1729):634–639. doi: 10.1098/rspb.2011.1349.
- B. Igc et J. W. Busch (2013). Is self-fertilization an evolutionary dead end? *New Phytologist*, 198(2): 386–397. doi: 10.1111/nph.12182.
- W. M. Janousek, M. R. Douglas, S. Cannings, M. A. Clément, C. M. Delphia, J. G. Everett, R. G. Hatfield, D. A. Keinath, J. B. U. Koch, L. M. McCabe, J. M. Mola, J. E. Ogilvie, I. Rangwala, L. L. Richardson, A. T. Rohde, J. P. Strange, L. M. Tronstad et T. A. Graves (2023). Recent and future declines of a historically widespread pollinator linked to climate, land cover, and pesticides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(5):e2211223120. doi: 10.1073/pnas.2211223120.
- M. Latron, J.-F. Arnaud, H. Ferla, C. Godé et A. Duputié (2018). Polymorphic nuclear markers for coastal plant species with dynamic geographic distributions, the rock samphire (*Crithmum maritimum*) and the vulnerable dune pansy (*Viola tricolor subsp. curtisii*). *Molecular Biology Reports*, 45(3):203–209. doi: 10.1007/s11033-018-4153-4.
- D. G. Lloyd (1992). Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, 153(3):370–380.
- G. Martin, C. Fontaine, F. Accatino et E. Porcher (2019). New indices for rapid assessment of pollination services based on crop yield data: France as a case study. *Ecological Indicators*, 101:355–363. doi: 10.1016/j.ecolind.2019.01.022.
- E. Noël, P. Jarne, S. Glémin, A. MacKenzie, A. Segard, V. Sarda et P. David (2017). Experimental evidence for the negative effects of self-fertilization on the adaptive potential of populations. *Current Biology*, 27(2):237–242. doi: 10.1016/j.cub.2016.11.015.
- J. Ollerton, R. Winfree et S. Tarrant (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120(3):321–326. doi: 10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x.

- R. Ornduff (1969). Reproductive biology in relation to systematics. *TAXON*, 18(2):121–133. doi: 10.2307/1218671.
- S. G. Potts, J. C. Biesmeijer, C. Kremen, P. Neumann, O. Schweiger et W. E. Kunin (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6):345–353. doi: 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- G. H. Pyke (1991). What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature*, 350(6313):58–59. doi: 10.1038/350058a0.
- S. E. Ramos et F. P. Schiestl (2019). Rapid plant evolution driven by the interaction of pollination and herbivory. *Science*, 364(6436):193–196. doi: 10.1126/science.aav6962.
- P. H. Raven et D. L. Wagner (2021). Agricultural intensification and climate change are rapidly decreasing insect biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(2):e2002548117. doi: 10.1073/pnas.2002548117.
- F. Rousset (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1):103–106. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x.
- A. Scoppola et E. Lattanzi (2012). *Viola* section *Melanium* (Violaceae) in Italy. New data on morphology of *Viola tricolor*-Group. *Webbia*, 67(1):47–64. doi: 10.1080/00837792.2012.10670908.
- A. Sicard et M. Lenhard (2011). The selfing syndrome: a model for studying the genetic and evolutionary basis of morphological adaptation in plants. *Annals of Botany*, 107(9):1433–1443. doi: 10.1093/aob/mcr023.
- G. L. Stebbins (1957). Self fertilization and population variability in the higher plants. *The American Naturalist*, 91(861):337–354. doi: 10.1086/281999.
- M. Thomann, E. Imbert, C. Devaux et P.-O. Cheptou (2013). Flowering plants under global pollinator decline. *Trends in Plant Science*, 18(7):353–359. doi: 10.1016/j.tplants.2013.04.002.
- M. Thomann, E. Imbert, R. C. Engstrand et P.-O. Cheptou (2015). Contemporary evolution of plant reproductive strategies under global change is revealed by stored seeds. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(4):766–778. doi: 10.1111/jeb.12603.
- W. N. Venables et B. D. Ripley (2002). *Modern applied statistics with S*. Statistics and computing. Springer, New York, 4th ed edition.
- L. J. Weider, P. D. Jeyasingh et D. Frisch (2018). Evolutionary aspects of resurrection ecology: progress, scope, and applications-An overview. *Evolutionary Applications*, 11(1):3–10. doi: 10.1111/eva.12563.
- A. Weinbach, N. Loeuille et R. P. Rohr (2022). Eco-evolutionary dynamics further weakens mutualistic interaction and coexistence under population decline. *Evolutionary Ecology*, 36(3):373–387. doi: 10.1007/s10682-022-10176-7.
- J. B. Whittall et S. A. Hodges (2007). Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature*, 447(7145):706–709. doi: 10.1038/nature05857.
- A. A. Winn, E. Elle, S. Kalisz, P.-O. Cheptou, C. G. Eckert, C. Goodwillie, M. O. Johnston, D. A. Moeller, R. H. Ree, R. D. Sargent et M. Vallejo-Marín (2011). Analysis of inbreeding depression in mixed-mating plants provides evidence for selective interference and stable mixed mating. *Evolution*, 65(12): 3339–3359. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01462.x.



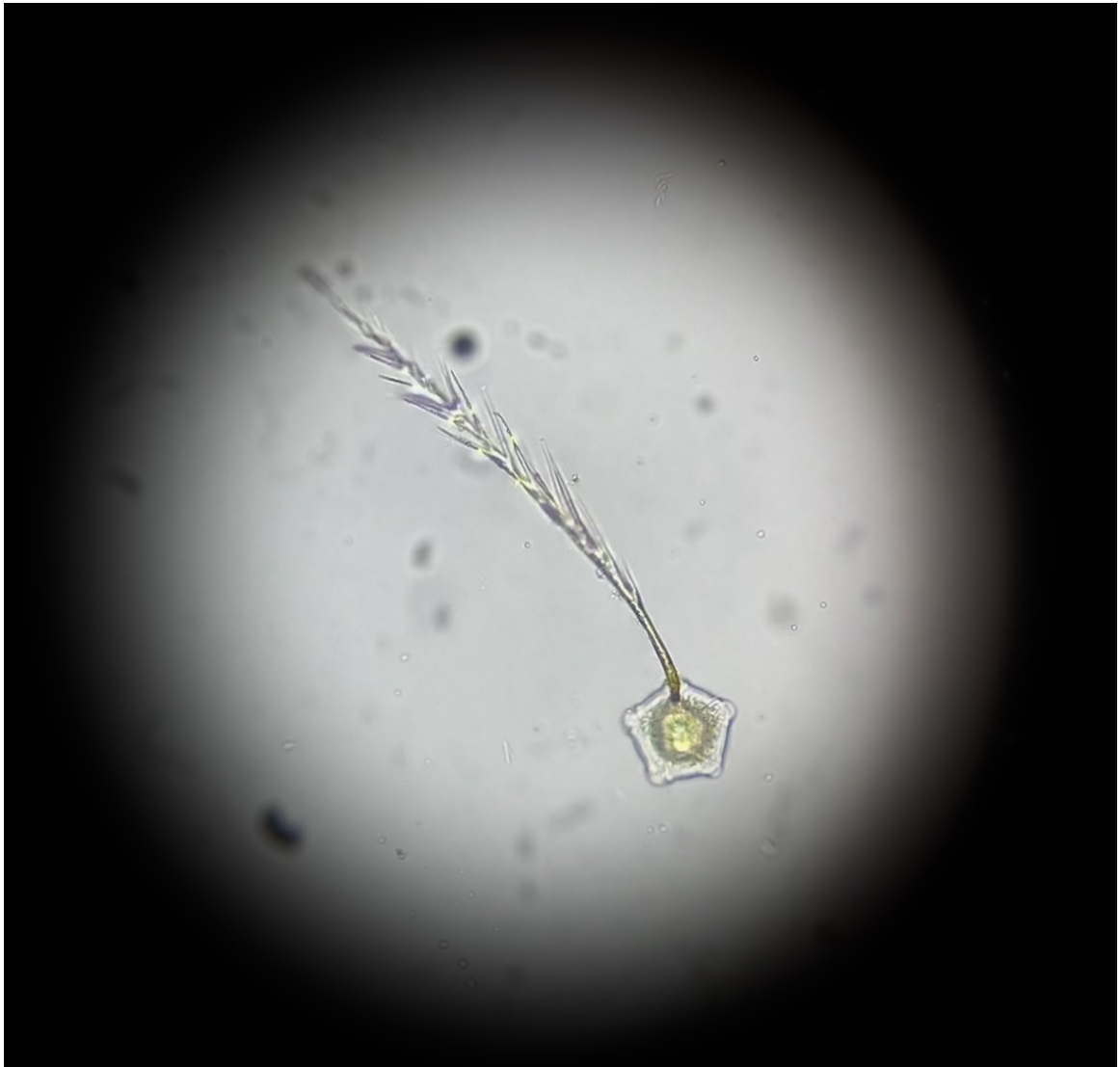
MANUSCRIT

II

CONSÉQUENCES DE L'ÉVOLUTION RAPIDE DE L'AUTOFÉCONDATION SUR LE RATIO
POLLEN/OVULE ET L'HÉTÉROMORPHISME POLLINIQUE



Cet article a été soumis pour publication.



Are there changes in pollen:ovule ratio and pollen heteromorphism consecutive to selfing syndrome evolution in *Viola arvensis*?

SAMSON ACOCA-PIDOLLE*, PERRINE GAUTHIER, AND PIERRE-OLIVIER CHEPTOU

CEFE, Univ. Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

*Corresponding author, email address: samson.acoca-pidolle@cefe.cnrs.fr

Abstract

- Pollen:ovule ratio is often lower in population experiencing higher selfing rates, likely due to higher pollination efficiency or lower male competition with increased selfing rates. Lower male competition would also impact pollen traits implied in pollen competition, such as the number of apertures.
- Using resurrection ecology methodology, four pairs of 90s-2000s ancestral and 2021 descendant populations of *Viola arvensis*, a pollen heteromorphic plant, were studied, for which increase in selfing rates and evolution of floral traits toward selfing syndrome has been demonstrated. Ovules and pollen were counted, while differentiating aperture morphs, for two successive generations grown in different environments.
- A decrease in pollen:ovule ratio between ancestral and descendent populations was found in the first generation, correlated to selfing rates changes, mainly due to pollen decrease but sometimes supported by an ovule increase, but not in the second generation. However, in both generations, pollen:ovule ratio exhibits spatial differentiation consistent with spatial differences in selfing rate. Concerning apertures of pollen grains, despite the three existing aperturate morphs, most individuals present mainly two morphs and no differences in pollen heteromorphism correlated with selfing rates were found.
- Pollen heteromorphism does not appear to have evolved in response to changes in selfing rates. Pollen:ovule ratio is a good indicator of selfing rate but differences between the first and the second generation highlight plasticity of pollen:ovule ratio. This suggests that pollen:ovule ratio is not canalized or/and may evolve in a longer timescale than the few decades investigated in our study.

Key words: Rapid evolution, pollen:ovule ratio, pollen heteromorphism, selfing syndrome, resurrection ecology, *Viola arvensis*

Introduction

Hermaphroditic individuals have the possibility to fertilize their ovules through their own pollen grains or through pollen from other individuals resulting in self-fertilization and cross-fertilization respectively. Cross-fertilization requires pollen vectors. Angiosperms are often pollinated by animals, particularly insects (Stephens et al., 2023). Animal pollination offers many advantages compared to wind or water pollination, such as the directional pollen transfer from flower to flower and a relative independence from abiotic factors.

Pollinators currently suffer a worldwide decline (Biesmeijer et al., 2006; Goulson et al., 2015; Janousek et al., 2023). The pollinator decline, likely leading to lower flower visitation rates, could induce limitation in (cross-) pollination, acting as a selective pressure favoring selfing (Lloyd, 1992; Thomann et al., 2013). The evolution toward higher selfing is associated with the decrease of a set of traits, among which herkogamy (anther-stigma distance), floral size or pollen:ovule ratio, together constituting the selfing syndrome. Rapid evolution of the selfing syndrome has been demonstrated experimentally in the absence of pollinators (Bodbyl Roels and Kelly, 2011; Gervasi and Schiestl, 2017; Ramos and Schiestl, 2019) and by comparing natural populations in pollinator-rich and pollinator-poor environments (Brys and Jacquemyn, 2012).

Low pollen:ovule ratios are selected during evolution toward selfing, likely due to a higher "efficiency in (self-) pollination" (Lloyd, 1965, p. 68). Indeed, autonomous selfing minimizes the exposure of pollen grains to adversity (loss or desiccation during pollen transfer) thus decreasing the number of pollen grains required to fertilize an ovule. Also, sex allocation theory predicts that selfing evolution reduces the pollen:ovule ratio due to lower local mate competition, especially male competition (Charnov, 1982).

Beyond pollen:ovule ratios, the decrease in male competition could also impact traits of male gametophytes directly. For example, pollen grain size or number of apertures are important parameters in male competition (Dajoz et al., 1991; McCallum and Chang, 2016). The number of apertures varies from one plant species to another and has increased during plant evolution (Dajoz et al., 1991). It can also vary within species and even within individual. The latter is called pollen heteromorphism (**Figure 1A**, Dajoz et al., 1991; Till-Bottraud et al., 1995). Pollen grains with more apertures have been shown to germinate faster on stigmas but exhibit slower pollen tube growth and lower longevity (Dajoz et al., 1991, 1993). Pollination context could thus favor different pollen morphs depending on the timing between anther dehiscence and arrival of pollen in stigmas. Theoretical models have shown that pollen heteromorphism can be selected by pollination heterogeneity over time in the case of pollen competition (Till-Bottraud et al., 1994). In the case of increased selfing, it is hypothesized that male competition and pollination heterogeneity will decrease ultimately leading to the loss of pollen heteromorphism. Predictions concerning the number of apertures in the case of transition to selfing are less trivial. Increased mean time of outcross pollen deposition would favor pollen grains with higher survival, thus low number of apertures. In contrast, without changes in mean time of pollen deposition, increased selfing would favor higher number of apertures as pollen with higher number of apertures will always outcompete outcross pollen on self-stigma and will also be good competitors on foreign stigmas. However, in natural populations, mean time of outcross pollen deposition and selfing propensity are likely positively correlated. Therefore, the evolution of selfing syndrome could drive the

evolution of pollen aperture number in opposite directions.

Differentiation in pollen:ovule ratio between species or populations have been widely studied in relation with mating system (Lloyd, 1965; Cruden, 1977; Plitmann and Levin, 1990; Mione and Anderson, 1992; Sicard and Lenhard, 2011; Brys and Jacquemyn, 2012; Harder and Johnson, 2023). However, pollen:ovule ratio changes have never been investigated, to our knowledge, in short-term evolution experiments (Bodbyl Roels and Kelly, 2011; Gervasi and Schiestl, 2017; Ramos and Schiestl, 2019). Comparing current populations with their ancestors, conserved as seeds in fridges, in common garden, following the resurrection ecology methods (Franks et al., 2018; Weider et al., 2018), recent studies have shown a rapid evolution toward selfing syndrome (Cheptou et al., 2022; Acoca-Pidolle et al., 2024). These natural experiments could help to understand how pollen and ovules evolves during the development of the selfing syndrome. Indeed, the pace of evolution of the different traits of selfing syndrome is still an open question (Sicard and Lenhard, 2011).

This study aims first at characterizing if the rapid evolution of floral traits toward selfing syndrome in natural environment has also been accompanied by the evolution of pollen:ovule ratio. The second aim is to characterize pollen heteromorphism change accompanying the evolution of selfing syndrome. To our knowledge, this study is the first to link pollen heteromorphism and selfing rate evolution. Using resurrection ecology methodology with 4 pairs of ancestral and descendant populations of *Viola arvensis*, a pollen heteromorphic plant (Mignot et al., 1995; Scoppola and Magrini, 2019), traits during two generations (F0 and F1) were measured to address the following questions:

- Does pollen:ovule ratio decrease with selfing rate? If so, is it due to pollen production decrease and/or ovule production increase?
- Is there a pollen heteromorphism change in response to the increased selfing rate and if it is the case, which aperturate morph is favored?

Material and methods

Study system and sampling

Table 1: Coordinates, year of sampling and estimated selfing rates of the eight populations of *Viola arvensis*
Estimation of selfing rates and 95% confidence intervals are from Acoca-Pidolle et al. (2024).

	Coordinates	Year of first sampling (ancestors) and selfing rate estimated (95% CI)	Year of second sampling (descendants) and selfing rate estimated (95% CI)
Commeny	49°7'37.11"N, 1°53'46.30"E	2001 0.74 (0.57–0.85)	2021 0.89 (0.66–1)
Crouy	49°24'24.31"N, 3°22'20.73"E	1993 0.66 (0.46–0.79)	2021 0.70 (0.55–0.80)
Guernes	49° 1'10.75"N, 1°38'46.82"E	2000 0.44 (0.22–0.64)	2021 0.80 (0.71–0.88)
Lhuys	49°16'35.40"N, 3°32'58.52"E	1992 0.33 (0.09–0.48)	2021 0.88 (0.78–0.95)

Viola arvensis arvensis Murray is an annual species of wild pansy (Violaceae). It is commonly found in fields as a weed or in meadows. The species is self-compatible with a mixed mating system (Scoppola and Lattanzi, 2012; Cheptou et al., 2022; Acoca-Pidolle et al., 2024). The flower possesses a tricarpeillary syncarpous ovary, each carpel containing several ovules with parietal placentation. The species presents a pollen heteromorphism; a single individual produces, within each anther, different pollen morphs with different numbers of apertures (Till-Bottraud et al., 1995; Scoppola and Magrini, 2019). *Viola arvensis* produces a majority of 5-aperturate pollen grains but can also produce 4- and 6-aperturate morphs (Figure 1A, Scoppola and Magrini, 2019).

Plants were sampled twice in agricultural fields in four locations of the Parisian Basin (see Table 1). The first sampling was done by the Conservatoire Botanique National de Bailleul in 1992 for Lhuys (Lh) and 1993 for Crouy (Cr), and by the Conservatoire Botanique National du Bassin Parisien in 2000 for Guernes (Gu) and 2001 for Commeny (Co). Seeds were collected by sampling fruits on a minimum of 100 mothers picked randomly in each population. The second sampling was performed in the same locations, in an area that overlapped the ancestral sampling area as much as possible, in February 2021 by randomly sampling 40 or more seedlings. The minimal sampling area was of 2,000 m² and corresponds to a case where all the population is circumscribed on this area. This sampling scheme produced four pairs, one for each location, of ancestral (A) and descendant (D) populations, thus eight populations in total.

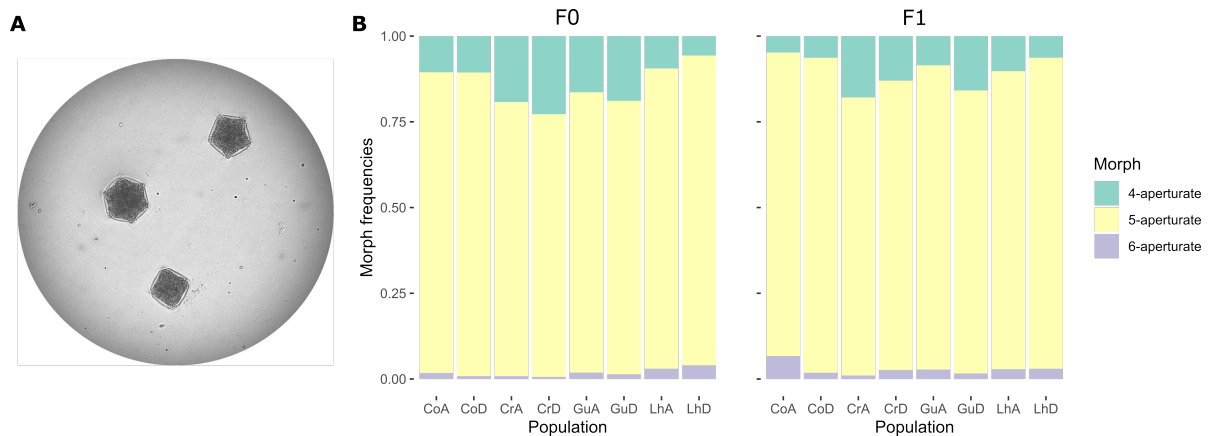


Figure 1: Pollen grain heteromorphism and population morph frequencies in *Viola arvensis*

(A) Picture of three pollen grains issued from a single anther of *Viola arvensis* (optical microscope, $\times 400$). Apertures are part of the pollen grain with a thinner cellular wall, corresponding to the angles. This image shows the three different types of pollen grains produced in our populations: 4-aperturate pollen (square-shaped), 5-aperturate pollen (pentagon-shaped) and 6-aperturate pollen (hexagon-shaped). (B) Morph frequencies in each population of F0- and F1-generations. 248 individuals were measured in F0 and 400 individuals representing 160 families were measured in F1. For exact values, see Table 2. The population first two letters are the name of the locality (Co = Commeny; Cr = Crouy; Gu = Guernes; Lh = Lhuys), "A" is for ancestral (collected in 2000 for Co, 1993 for Cr, 2001 for Gu and 1992 for Lh) and "D" for descendant (all collected in 2021).

Experimental design

In accordance with resurrection methodology (Franks et al., 2018), a refresher generation (F0) was grown in common garden with plants (A and D) originated from the field. As ancestral populations were stored seeds and descendant ones were collected at seedling stage in the field due to time constrains, common conditions for the F0 started at seedling stage. For ancestral populations, in mid-November

2020, seed lots were placed in germination chambers in petri dishes with vermiculite under light at 15°C for 12h and in the dark at 6°C for 12h. Germination rates were of 50% to 65%. 32 seedlings of ancestral and descendant populations were transplanted in late February 2021 in the field of the Baillarguet site of the experimental platform "Terrains d'Expériences" of the Labex Cemeb, 10 km north of Montpellier, France (43°40'53.92"N, 3°52'28.74"E). Two events of mortality were observed, one in CrD and one in LhD populations. Populations were separated in insect-proof mesh cages (Appendix S1). During full blooming, in mid-April, commercial bumblebee hives were introduced, Natupol from Koppert France® (Cavaillon, France), into the cages avoiding gene flow between populations to produce a second generation of open pollinated individuals with similar maternal effects. One to three fruits per individual produced in this pollination context were collected and mixed into a single batch of seeds.

These collected seeds produced by the F0 generation were used to grow a new generation (F1). 20 mother plants per population in the F0 generation were randomly selected to construct 20 families in the F1 generation. In December 2021, 30 seeds per family were placed in germination chambers in petri dishes with vermiculite under light at 15°C for 12h and in the dark at 6°C for 12h, to obtain enough plants for measurements. Germination rates per population range between 75% and 90%. In each family five seedlings were selected to establish families, each composed of five siblings. Three families did not germinate enough to obtain five plants and thus were composed of one, two and four siblings. Plants were placed in individual pots (11×11×11 cm³) filled with standardized soil in late February and randomized in a greenhouse of the experimental platform "Terrains d'Expériences". Watering was manual and was done when needed. In total, F1 generation was constituted of 792 plants, no early mortality was observed.

Individuals used in this study are the same as those used in the previous study of *Acoca-Pidolle et al.* (2024).

Measurements of ovule and pollen production

Ovule and pollen productions were measured in both, F0 and F1 generations using the same procedure. One bud close to anthesis per plant was collected and frozen at -20 °C in a labelled tube. For F0-individuals, buds were sampled within two days in May 2021. For F1-individuals, collection was performed between 26 April and 12 May 2022, only in the main stem, recording floral position (number of flowers that already bloom on the main stem). Up to 28 months after collection, between July and October 2023, buds were defrosted and dissected. Under binocular magnifier, one of the five anthers was dilacerated in a drop of lactic acid on a microscope slide and then counted under microscope the three morphs of pollen grains (4-, 5-, or 6-aperturate, **Figure 1A**) using a mounted bank of three counters. The ovary was isolated, incised under binocular magnifier and ovules were manually counted. A single experimenter dissected all the F0-buds and counted F0-ovules and F0-pollen grains. Another experimenter dissected all the F1-buds and counted F1-ovules while F1-pollen grains were counted by the same experimenter as for F0. The second experimenter used the same procedure and was formed by the first one and comparison of counts by the two experimenters did not show any differences.

Data analysis

The pollen:ovule ratio was calculated by multiplying the number of pollen grains contained in one anther by five to obtain a flower-wide estimate, divided by the number of ovules. A linear regression between the mean pollen:ovule ratio of each population in F0 and measures of population selfing rates estimated from F_{IS} by Acoca-Pidolle et al. (2024), reported in **Table 1**, was performed.

The frequency of each morph was computed as the number of counted grains of the given morph divided by the total pollen count. Pollen heteromorphism can be divided in two components, the first the mean number of apertures of pollen grains within an individual and the second the diversity of the number of apertures within an individual. The mean number of apertures was calculated multiplying frequencies of morphs by the number of apertures they exhibit. Pollen diversity was calculated using Simpson's D diversity index, which measures the probability to sample, by chance, two pollen grains of different morphs, thus: $D = 1 - \sum_i \frac{N_i(N_i-1)}{N(N-1)}$ with N the total number of pollen grains and N_i the number of pollen grains of i^{th} morph. An individual producing only five-aperturate pollen grains has a mean number of apertures of 5 and a diversity of 0. An individual producing an equal mix of four- and six-aperturate pollen grains also has a mean number of apertures of 5 but a diversity around 0.5. In case of only two morphs a and b , and considering a sufficiently large number of pollen grains to reach $N_i - 1$ approximatively equal to N_i for any i and thus $N - 1$ approximatively equal to N , $D_{a,b} = 1 - \frac{N^2(f_a^2 + f_b^2)}{N^2}$, with f_a and f_b the frequencies of morph a and b respectively; and the mean number of apertures, $\bar{x}_{a,b} = n_a f_a + n_b f_b$, with n_a and n_b the number of apertures of morph a and b respectively. Then because $f_b = 1 - f_a$: $D_{a,b} = 2f_a(1 - f_a)$ and $f_a = \frac{\bar{x}_{a,b} - n_b}{n_a - n_b} \Rightarrow D_{a,b} = 2 \frac{\bar{x}_{a,b} - n_b}{n_a - n_b} (1 - \frac{\bar{x}_{a,b} - n_b}{n_a - n_b})$, linking pollen diversity and mean number of apertures by a second-degree function (parabola). These theoretical parabolas were used to help visual representation of data.

Statistical analyses were conducted in F0 generation using linear models with each trait as response variable, age (ancestral or descendant), locality (four localities), and the interaction between age and locality as fixed factors. Ovule and pollen numbers were analyzed with the same structure given normality of residuals. In the F1-generation, in order to take into account family, date of collection and floral position as random factors, linear mixed models (LMMs) were performed with the same structure used for F0-analyses. Pollen:ovule ratio was transformed using the log transformation, and pollen diversity using the square root transformation to improve normality of residual errors. Pollen frequencies were not directly tested because their variations are totally captured by mean pollen aperture and pollen diversity variations. All our statistical analyses were performed using the R software (R Core Team, Version 4.2.1). LMMs were performed using the "lmer" function implemented in the package LME4 (Bates et al., 2015).

Results

Pollen and ovule production

Overall, mean pollen:ovule ratios vary from 42.8 to 52.5 (**Table 2**). In F0, there is a decrease in pollen production and therefore in pollen:ovule ratio between ancestral and descendant populations (**Table 2**). The temporal decrease in pollen:ovule ratio is consistent across all the localities (**Figure 2**) and negatively

Table 2: Mean (SD) of ovule and pollen traits measured

A single bud per individual (*N*) was collected just before anthesis and dissected to count ovules and pollen grains contained inside. Statistical analyses are conducted using linear models in F0-generation and linear mixed models in F1-generation. For additional information, see "Material and methods" section. The population first two letters are the name of the locality (Co = Commeny; Cr = Crouy; Gu = Guernes; Lh = Lhuys), "A" is for ancestral (collected in 2000 for Co, 1993 for Cr, 2001 for Gu and 1992 for Lh) and "D" for descendant (all collected in 2021).

Trait	<i>N</i>	CoA CoD	CrA CrD	GuA GuD	LhA LhD	Factor	Statistic value	df	<i>P</i>
Generation F0							<i>F</i> _{df,N-S}		
Number of ovules	249	78.0 (13.6)	72.4 (5.9)	72.8 (7.9)	66.2 (6.3)	Age	0.002	1	0.961
		82.6 (7.1)	63.2 (7.5)	76.1 (7.4)	67.3 (5.5)	Locality	38.538	3	<0.001
						Age × Locality	9.297	3	<0.001
Number of pollen grains per anther	248	701 (84)	645 (71)	693 (116)	691 (58)	Age	12.821	1	<0.001
		705 (84)	549 (76)	681 (88)	636 (88)	Locality	17.581	3	<0.001
						Age × Locality	4.274	3	0.006
Pollen:ovule ratio	248	45.8 (6.7)	44.7 (4.6)	47.7 (7.0)	52.5 (5.2)	Age	16.087	1	<0.001
		42.8 (5.0)	43.2 (5.0)	45.0 (6.3)	47.5 (7.2)	Locality	12.933	3	<0.001
						Age × Locality	0.802	3	0.494
Pollen diversity	248	0.19 (0.14)	0.26 (0.16)	0.24 (0.14)	0.20 (0.12)	Age	0.607	1	0.437
		0.19 (0.11)	0.32 (0.14)	0.28 (0.15)	0.16 (0.10)	Locality	9.467	3	<0.001
						Age × Locality	1.477	3	0.221
Mean number of apertures	248	4.91 (0.15)	4.82 (0.19)	4.85 (0.20)	4.94 (0.14)	Age	0.116	1	0.733
		4.90 (0.09)	4.78 (0.16)	4.82 (0.18)	4.98 (0.13)	Locality	12.458	3	<0.001
						Age × Locality	0.928	3	0.428
Frequency of 4-aperturate morph	248	0.11 (0.13) 0.11 (0.08)	0.19 (0.18) 0.23 (0.16)	0.16 (0.19) 0.19 (0.16)	0.09 (0.12) 0.06 (0.10)				
Frequency of 5-aperturate morph	248	0.88 (0.12) 0.89 (0.07)	0.80 (0.17) 0.77 (0.15)	0.82 (0.17) 0.80 (0.16)	0.88 (0.11) 0.90 (0.09)				
Frequency of 6-aperturate morph	248	0.02 (0.03) 0.01 (0.03)	0.01 (0.01) 0.01 (0.01)	0.02 (0.03) 0.01 (0.04)	0.03 (0.03) 0.04 (0.04)				
Generation F1							<i>χ</i> ²		
Number of ovules	400	80.6 (12.3)	75.3 (10.0)	79.9 (8.3)	76.1 (6.5)	Age	0.117	1	0.733
		81.7 (5.4)	77.9 (7.6)	75.3 (8.2)	76.3 (5.9)	Locality	5.601	3	0.004
						Age × Locality	2.397	3	0.090
Number of pollen grains per anther	400	746 (128)	681 (112)	779 (110)	722 (96)	Age	0.003	1	0.958
		765 (91)	687 (96)	709 (115)	743 (85)	Locality	29.557	3	<0.001
						Age × Locality	9.502	3	0.023
Pollen:ovule ratio	400	46.4 (5.5)	45.5 (6.5)	49.1 (7.8)	47.6 (6.4)	Age	0.087	1	0.768
		46.8 (4.7)	44.2 (5.8)	47.2 (6.6)	48.8 (5.0)	Locality	19.357	3	<0.001
						Age × Locality	3.371	3	0.338
Pollen diversity	400	0.16 (0.12)	0.26 (0.14)	0.17 (0.11)	0.21 (0.12)	Age	0.282	1	0.596
		0.14 (0.09)	0.22 (0.13)	0.25 (0.14)	0.16 (0.10)	Locality	29.049	3	<0.001
						Age × Locality	15.042	3	0.002
Mean number of apertures	400	5.02 (0.19)	4.83 (0.17)	4.94 (0.16)	4.93 (0.13)	Age	0.495	1	0.482
		4.95 (0.08)	4.90 (0.18)	4.86 (0.17)	4.97 (0.09)	Locality	26.470	3	<0.001
						Age × Locality	12.108	3	0.007
Frequency of 4-aperturate morph	400	0.05 (0.09) 0.06 (0.06)	0.18 (0.17) 0.13 (0.16)	0.09 (0.14) 0.16 (0.16)	0.10 (0.10) 0.06 (0.07)				
Frequency of 5-aperturate morph	400	0.88 (0.15) 0.92 (0.06)	0.81 (0.16) 0.84 (0.15)	0.89 (0.13) 0.83 (0.15)	0.87 (0.10) 0.91 (0.07)				
Frequency of 6-aperturate morph	400	0.07 (0.14) 0.02 (0.03)	0.01 (0.02) 0.03 (0.04)	0.03 (0.05) 0.02 (0.02)	0.03 (0.06) 0.03 (0.04)				

correlated to increasing selfing rates ($r = -0.73, r^2 = 0.45, p_{value} = 0.04$; **Figure 3, Table 1**). However, such difference between **Figure 2**). F1-plants, grown in greenhouse, produce more ovules and more pollen grains in general (**Table 2**). This increase investment in reproduction is more important in pollen production leading to an increase in pollen:ovule ratio between F0 and F1 (**Figure 2, Table 2**).

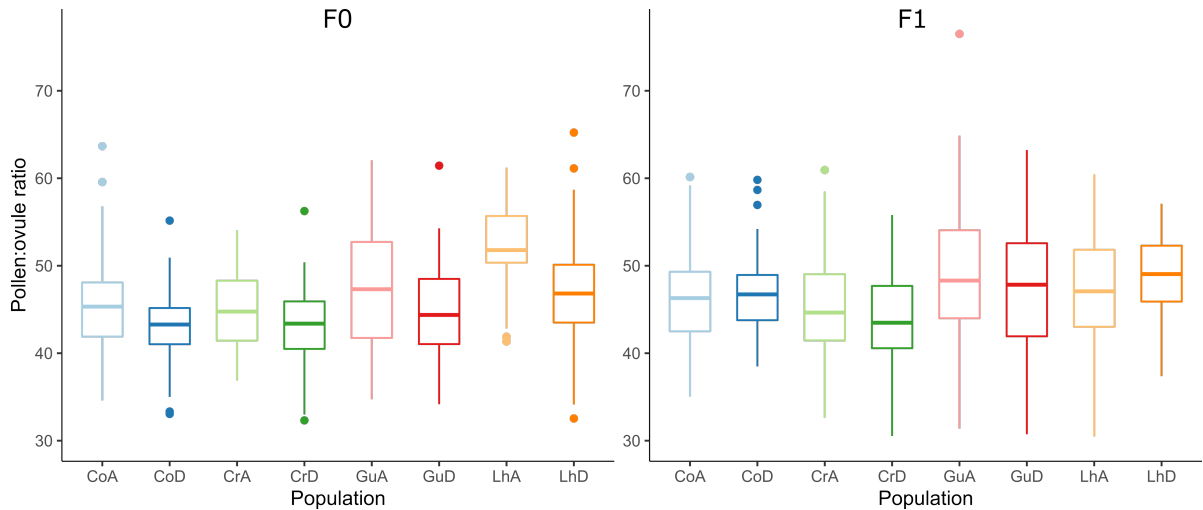


Figure 2: Pollen:ovule ratio of four pairs of ancestral and descendant populations of *Viola arvensis*

The pollen:ovule ratio is calculated as the total amount of pollen produced by a flower (number of pollen grains per anther multiplied by 5), divided by the number of ovules. The left panel represents the pollen:ovule ratio measured on 248 individuals in F0-generation, while the right one is measured on 400 individuals representing 160 families in F1-generation. The population first two letters are the name of the locality (Co = Commeny; Cr = Crouy; Gu = Guernes; Lh = Lhuys), "A" is for ancestral (collected in 2000 for Co, 1993 for Cr, 2001 for Gu and 1992 for Lh) and "D" for descendant (all collected in 2021).

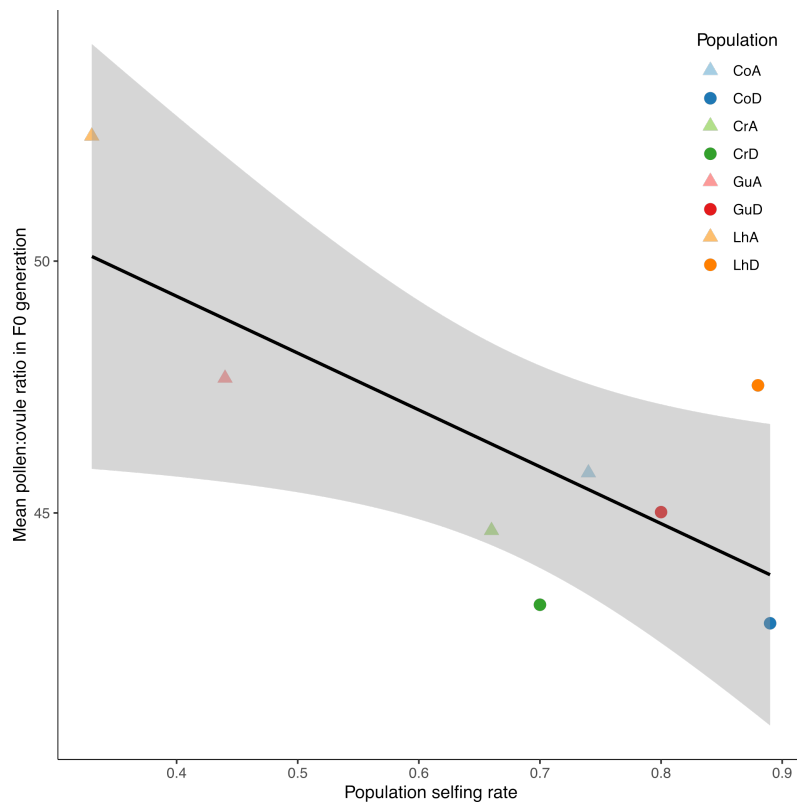


Figure 3: Relation between pollen:ovule ratio in populations of *Viola arvensis* and their selfing rates

Mean pollen:ovule ratio is measured in one bud of each of the 32 individuals per population. Selfing rates are estimated while genotyping 11 microsatellites of the 32 individuals of each population and computing FIS. The population first two letters are the name of the locality (Co = Commeny; Cr = Crouy; Gu = Guernes; Lh = Lhuys), "A" (▲) is for ancestral (collected in 2000 for Co, 1993 for Cr, 2001 for Gu and 1992 for Lh) and "D" (●) for descendant (all collected in 2021).

Differences among localities (spatial) were found in all the traits on both generations and consistent between the two generations (Table 2). Pollen:ovule ratio is the lowest in Commeny and Crouy populations (Figure 2). In F0, only ovule and pollen numbers revealed interactions between temporal and spatial variation, while it is not the case for pollen:ovule ratio (Table 2). Pollen number decreases through time for all the localities, except for Commeny experiencing no change. However, ovule number increases in Commeny and Guernes, while Crouy experience a decrease and Lhuys no change. In F1, only pollen production exhibits temporal \times spatial interaction and are inconsistent with F0 interaction (Table 2).

Pollen heteromorphism

No individual among the 648 (248 in F0 and 400 in F1) observed presents monomorphic pollen and 144 present only two morphs (72 in F0: 6 without 4-aperturate morph and 66 without 6-aperturate morph, and 72 in F1: 14 without 4-aperturate morph and 58 without 6-aperturate morph; on the plain curves in Figure 4). Consistently in F0 and F1, the dominant morph is the 5-aperturate morph followed by the 4-aperturate morph and finally the 6-aperturate morph is rare, but frequency is never zero in all the populations (Figure 1B, Table 2). Interestingly, no individual is presenting only 4- and 6-aperturate morphs nor high frequencies of both morphs together, the highest frequency of both types is an individual with 24% 4-aperturate morph and 5% 6-aperturate morph, while each morph can be

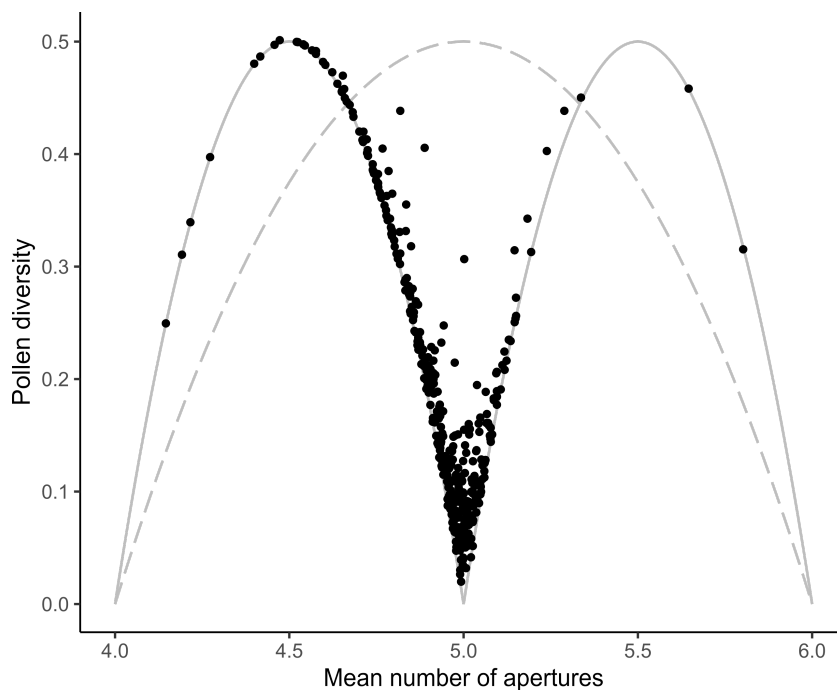


Figure 4: Patterns of pollen heteromorphism in individuals of *Viola arvensis*

Pollen diversity as a function of the mean number of apertures observed in a single anther of *Viola arvensis* in F1-generation. All population are pooled together and each point corresponds to a single individual ($N = 400$). The plain line is the expected pollen diversity in function of the mean number of apertures given only two morphs, 4- and 5-aperturate or 5- and 6-aperturate (see "Materials and methods"). The dashed line is the expected pollen diversity in function of the mean number of apertures given only 4- and 6-aperturate morphs. Points not aligned in the grey lines are individuals presenting 4-, 5- and 6-aperturate morphs together. The highest pollen diversity could be reach for an equal balanced frequency of $\frac{1}{3}$ of each morph, given a mean value of 5 apertures and a pollen diversity of 0.66.

present up to 80% individually (see predicted dashed curve in **Figure 4**). Individuals with lower mean aperture frequently exhibit only 4- and 5-aperturate morphs revealing a positive correlation between the absence of the 6-aperturate morph and the frequency of the 4-aperturate one (glmm estimate = 20.72, $z = 4.85$, $P < 0.001$, see predicted plain curve in **Figure 4**). The individuals with three morphs possess pollen diversity far below the maximum of $\frac{2}{3}$, expected when the three morphs are in equal frequency, and several are close to pollen diversity expectation for individuals possessing only two morphs, the 5-aperturate morphs with either 4- or 6-aperturate ones revealing that in this case the minority morph is present at very low frequencies (**Figure 4**).

There is a slight tendency of increase in frequency of dominant 5-aperturate morph between F0 and F1 leading to a slight increase in the mean number of aperture (the second most common morph is the 4-aperturate one) and a decrease in pollen diversity (**Table 2**). No difference in pollen heteromorphism was found between ancestral and descendant populations, however there is significant locality effects in all the traits (**Table 2**). Consistently between F0 and F1, Commeny and Lhuys show the lowest pollen diversities and the highest mean numbers of apertures, mainly driven by the lowest 4-aperturate morph frequencies. In F1, pollen diversity and mean apertures show interactions between locality and age. Pollen diversity decreases between ancestral and descendant populations in all the localities, except in Guernes experiencing the reverse and mean number of apertures decreases between ancestral and descendant populations in Commeny and Guernes, while increases in Crouy and Lhuys.

Discussion

This study aimed at studying if pollen:ovule ratio and pollen heteromorphism have changed following the rapid increase of selfing in *Viola arvensis*. Overall, the pollen:ovule ratios measured are consistent with the high selfing rates of this species (**Table 1**, Cruden, 1977). A decrease in pollen:ovule ratio was measured between ancestral and descendant populations in F0-generation. This decrease in pollen:ovule ratio is correlated to increased selfing rates. The decrease in pollen:ovule ratio is either due to a higher ovule number or a lower pollen number in descendant populations. However, no more differences were found in F1-generation. No differences were found between ancestral and descendant populations in pollen heteromorphism. Nevertheless, this study highlights spatial differentiation in pollen:ovule ratio, either due to a higher ovule number or a lower pollen number, and in pollen heteromorphism. The distribution of pollen morphs is not random and despite the usual occurrence of the three morphs together, there is often two morphs, the 5-aperturate accompanied by one of the two others. Finally, the comparison between F0 and F1 highlights that pollen:ovule ratio and pollen heteromorphism are plastic traits.

Individual and population differences in pollen heteromorphism

None of the individuals presents monomorphism which is consistent with the model predicting that, under conditions for stability of pollen heteromorphism, all individuals should be heteromorphic (Till-Bottraud et al., 1994). However, not all plants present all morphs of pollen and 4- and 6-aperturate morphs exclude each other. 4- and 6-aperturate morphs were never found in high frequency together which could in theory be selected given that they should respectively represent the fittest morph to two exclusive strategies, late and early pollination (Dajoz et al., 1993; Till-Bottraud et al., 1994). This

could be due to developmental constraints on aperture number. Studying the meiotic process and tetrad organization in these populations of *Viola arvensis* could help to understand the production of the three morphs and the absence of coexistence at high frequency of 4- and 6-aperturate morph (Mignot et al., 1995; Ressayre et al., 1998, 2002). At the population level, 6-aperturate morph can be in very low frequency but is never zero, which could correspond to the rate of sporadic problems, or constraints, in pollen development or be the signature of a selective advantage of the rare (negative frequency dependent selection). Indeed, 6-aperturate morph are highly competitive in other stigma while receptive individuals are not producing 6-aperturate morph themselves (Acoca-Pidolle & Cheptou, *in prep*). Therefore, if 6-aperturate morph is in too high frequency in the population, the higher probability of pollen deposition in receptive individuals producing 6-aperturate morph themselves reduces the advantage of this morph during early pollination and the cost on delayed pollination is selecting against it, which could explain the low frequencies (Dajoz et al., 1993).

There is no difference in pollen heteromorphism between ancestral and descendant populations. This trait stasis may be the result of the short timescale observed, of developmental constraints but also of selective processes. A high number of apertures favors selfing of the focal individual but also outcrossing of other individuals in the population, therefore aperture number could be under stabilizing selection during an increase in selfing rates (Acoca-Pidolle & Cheptou, *in prep*). Nonetheless, spatial differentiation has no obvious link to mating system and could be caused by drift or local adaptation. The latter could be due to local conditions affecting pollination, such as pollination intensity and timing, intensity of pollen competition due to population demography (Dajoz, 1999), or local environmental conditions affecting male meiosis (De Storme and Geelen, 2014). Therefore, links between pollen heteromorphism and mating system are difficult to assess, despite they are likely, and further theoretical and experimental investigations are needed.

Population differentiation in pollen:ovule ratio

F0 shows a consistent and significant decrease between ancestral and descendant populations in pollen:ovule ratio among the four localities. This decrease in pollen:ovule ratio is consistent with previously measured increase in selfing rates of these localities, which is consistent with Cruden's hypothesis of pollen:ovule ratio as a good indicator of mating system (Cruden, 1977; Plitmann and Levin, 1990; Mione and Anderson, 1992). However, the low correlation found between outcrossing rates and pollen:ovule ratios of several species by Harder and Johnson (2023) highlights that this indicator is weak when comparing species with different ecology and pollinators. Therefore, the use of pollen:ovule ratio to compare mating system is likely relevant to closely relative taxa but not distant ones.

This decrease in pollen:ovule ratio is driven by an overall significant decrease over time in pollen production, which is consistent with the pattern observed in other evolution of pollen:ovule ratios, for example in *Centaureum erythraea* (Brys and Jacquemyn, 2012; Harder and Johnson, 2023). Interactions between spatial and temporal factors for pollen and ovule productions but not for pollen:ovule ratio highlight that the similar decrease of pollen:ovule ratio in all the populations is either mainly due to decrease in pollen production or increase in ovule production. Indeed, populations experiencing almost no decrease in pollen production experience an increase in ovule production (Commeny and to a lesser extent Guernes), suggesting that the increase in ovule number is also a potential evolutionary pathway to reach lower pollen:ovule ratios. Populations experiencing increase in ovule production are also the

one experiencing the greatest reduction in floral traits measured in a previous study (Acoca-Pidolle et al., 2024), suggesting that reallocation from floral traits is a prerequisite for increased ovule number and therefore for fitness benefits of selfing syndrome (Sicard and Lenhard, 2011).

Why pollen:ovule ratio and pollen heteromorphism differ between F0 and F1?

While pollen:ovule ratio patterns are consistent with selfing rates in F0, no consistent differences are observed between ancestral and descendant populations in ovule or pollen productions, or pollen:ovule ratio in F1. Such discrepancies could be due to differences in inbreeding between ancestral and descendant populations that have been erased by the artificial pollination in F1. However, sequencing of F1-generation still show differences in selfing rates between ancestral and descendant populations and measured inbreeding depression are inferior to 5% (Acoca-Pidolle & Cheptou, *in prep*). Then, such factors cannot account for the differences observed. Differences in maternal effects could be the source of the differences observed in F0, before being erased in F1. However, it supposes that the four ancestral populations, collecting in four different years possess similar maternal effects compare to the descendant generation, sampled within a single year. Differences in early life stage between ancestral and descendant populations could also be an explanation. Indeed, ancestral populations were stored in fridge several years and germinated in control environment while descendant populations were harvested at seedling stage in natural environment. This could also be due to differences between F0 and F1 growing conditions, expressing or not differences between ancestral and descendant populations. The overall increase in pollen:ovule ratio between F0 and F1, despite an increase of both ovule and pollen production, highlights environmental effects on per flower sex investment and allocation. F0 was grown directly in the field, while F1 was grown in pots in a greenhouse. This suggests that environment promoting per flower sex investment in general, greenhouse in this case, is biased toward allocation to male function. This difference could also be due to bias in bud positions between F0 and F1 collection due to differences in plant life stage (Delesalle et al., 2008). In any case, this prevents to conclude to a rapid consistent evolution of pollen:ovule ratio in these populations, whereas F0 environmental conditions are likely closer to natural conditions.

There are also differences in pollen heteromorphism between F0 and F1, with a decrease in pollen diversity in F1 in favor of the 5-aperturate morph. This suggests that pollen heteromorphism and morph frequencies could be influenced by the number of unstable male meiosis, highly important in the aperture production (Mignot et al., 1995; Ressayre et al., 1998, 2002), which is known to be highly dependent of the environment (De Storme and Geelen, 2014).

Pace of evolution of the selfing syndrome

Although differences in pollen and ovule productions, and pollen:ovule ratio between ancestral and descendant populations are inconsistent between F0 and F1, differences between localities are consistent. The two populations having the lowest pollen:ovule ratio, either having the highest ovule number or the lowest pollen amount, are also those possessing the highest selfing rate in ancestral populations. This population differentiation suggests evolution at the timescale of population divergence (20 km separate the closest populations and 140 km the farthest, while seeds dispersal is limited to few meters, personal observations). This differentiation followed two different paths, reduction in male allocation

or increase in female allocation. Therefore, pollen:ovule ratio can evolve in response to mating system but it seems slower and delayed compared to other traits of the selfing syndrome, such as floral area or nectar production which show rapid evolution in our localities (Acoca-Pidolle et al., 2024). At least, the differences between F0 and F1 suggest that pollen:ovule ratio is not well canalized at the timescale of the recent selfing syndrome evolution.

In conclusion, no rapid evolution of pollen heteromorphism has been observed and spatial differences of pollen heteromorphism appear independent of the mating system of populations. This stasis may be due to opposite selective forces on aperture number during the evolution of the selfing syndrome. Differences between the two generations in sex investment and allocation were found, revealing environmental effects and rendering rapid evolution difficult to assess in our experiment. However, pollen:ovule ratios are well linked to selfing rates, at least at the spatial scale. Therefore, low pollen:ovule ratio is likely to evolve later or slower during evolution toward selfing syndrome.

Acknowledgments

The authors thank David Delguerde for construction and installation of insect-proof cages, Pauline Durbin and Fabien Lopez for help in taking care of the plants during the experiment, the Conservatoire Botanique National de Bailleul and the Conservatoire Botanique National du Bassin Parisien for the supply of seeds and information on sampling locations.

Competing interests

Authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

S.A.-P.: Conceptualisation, investigation, data collection, formal analysis, visualisation, writing. P.G.: Investigation, data collection, writing. P.-O.C.: Conceptualisation, writing, supervision.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study will be openly available in data.InDoRES as soon as this study is published.

References

- S. Acoca-Pidolle, P. Gauthier, L. Devresse, A. Deverge Merdrignac, V. Pons et P.-O. Cheptou (2024). Ongoing convergent evolution of a selfing syndrome threatens plant-pollinator interactions. *New Phytologist*, 242(2):717–726. doi: 10.1111/nph.19422.
- D. Bates, M. Mächler, B. Bolker et S. Walker (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1):1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01.

- J. C. Biesmeijer, S. P. M. Roberts, M. Reemer, R. Ohlemüller, M. Edwards, T. Peeters, A. P. Schaffers, S. G. Potts, R. Kleukers, C. D. Thomas, J. Settele et W. E. Kunin (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313(5785):351–354. doi: 10.1126/science.1127863.
- S. A. Bodbyl Roels et J. K. Kelly (2011). Rapid evolution caused by pollinator loss in *Mimulus guttatus*. *Evolution*, 65(9):2541–2552. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01326.x.
- R. Brys et H. Jacquemyn (2012). Effects of human-mediated pollinator impoverishment on floral traits and mating patterns in a short-lived herb: an experimental approach. *Functional Ecology*, 26(1):189–197. doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01923.x.
- E. L. Charnov (1982). The theory of sex allocation. *Monographs in Population Biology*, 18:1–355.
- P.-O. Cheptou, E. Imbert et M. Thomann (2022). Rapid evolution of selfing syndrome traits in *Viola arvensis* revealed by resurrection ecology. *American Journal of Botany*, 109(11):1838–1846. doi: 10.1002/ajb2.16028.
- R. W. Cruden (1977). Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31(1):32. doi: 10.2307/2407542.
- I. Dajoz (1999). The distribution of pollen heteromorphism in *Viola*: ecological and morphological correlates. *Evolutionary Ecology Research*, 1:97–109.
- I. Dajoz, I. Till-Bottraud et P.-H. Gouyon (1991). Evolution of pollen morphology. *Science*, 253(5015):66–68. doi: 10.1126/science.253.5015.66.
- I. Dajoz, I. Till-Bottraud et P.-H. Gouyon (1993). Pollen aperture polymorphism and gametophyte performance in *Viola diversifolia*. *Evolution*, 47(4):1080–1093. doi: 10.1111/j.1558-5646.1993.tb02137.x.
- N. De Storme et D. Geelen (2014). The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms. *Plant, Cell & Environment*, 37(1):1–18. doi: 10.1111/pce.12142.
- V. A. Delesalle, S. J. Mazer et H. Paz (2008). Temporal variation in the pollen:ovule ratios of *Clarkia* (Onagraceae) taxa with contrasting mating systems: field populations. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(1):310–323. doi: 10.1111/j.1420-9101.2007.01444.x.
- S. J. Franks, E. Hamann et A. E. Weis (2018). Using the resurrection approach to understand contemporary evolution in changing environments. *Evolutionary Applications*, 11(1):17–28. doi: 10.1111/eva.12528.
- D. D. L. Gervasi et F. P. Schiestl (2017). Real-time divergent evolution in plants driven by pollinators. *Nature Communications*, 8(1):14691. doi: 10.1038/ncomms14691.
- D. Goulson, E. Nicholls, C. Botías et E. L. Rotheray (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229):1255957. doi: 10.1126/science.1255957.
- L. D. Harder et S. D. Johnson (2023). Beyond pollen:ovule ratios: Evolutionary consequences of pollinator dependence and pollination efficiency for pollen and ovule production in angiosperms. *American Journal of Botany*, 110(6):e16177. doi: 10.1002/ajb2.16177.
- W. M. Janousek, M. R. Douglas, S. Cannings, M. A. Clément, C. M. Delphia, J. G. Everett, R. G. Hatfield, D. A. Keinath, J. B. U. Koch, L. M. McCabe, J. M. Mola, J. E. Ogilvie, I. Rangwala, L. L. Richardson, A. T. Rohde, J. P. Strange, L. M. Tronstad et T. A. Graves (2023). Recent and future declines of a historically widespread pollinator linked to climate, land cover, and pesticides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(5):e2211223120. doi: 10.1073/pnas.2211223120.

- D. G. Lloyd (1965). Evolution of self-compatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University*, (195):3–134.
- D. G. Lloyd (1992). Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, 153(3):370–380.
- B. McCallum et S.-M. Chang (2016). Pollen competition in style: effects of pollen size on siring success in the hermaphroditic common morning glory, *Ipomoea purpurea*. *American Journal of Botany*, 103(3):460–470. doi: 10.3732/ajb.1500211.
- A. Mignot, I. Dajoz et I. Till-Bottraud (1995). Heteromorphism of pollen aperture number and heterogeneity at the tetrad stage in two *Viola* species and *Nicotiana tabacum*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, Série III-Sciences de la vie/Life sciences*, 318(4):453–457.
- T. Mione et G. J. Anderson (1992). Pollen-ovule ratios and breeding system evolution in *Solanum* section *Basarthurum* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 79(3):279–287. doi: 10.1002/j.1537-2197.1992.tb14549.x.
- U. Plitmann et D. A. Levin (1990). Breeding systems in the Polemoniaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 170(3-4):205–214. doi: 10.1007/BF00937704.
- S. E. Ramos et F. P. Schiestl (2019). Rapid plant evolution driven by the interaction of pollination and herbivory. *Science*, 364(6436):193–196. doi: 10.1126/science.aav6962.
- A. Ressayre, B. Godelle, A. Mignot et P.-H. Gouyon (1998). A morphogenetic model accounting for pollen aperture pattern in flowering plants. *Journal of Theoretical Biology*, 193(2):321–334. doi: 10.1006/jtbi.1998.0704.
- A. Ressayre, B. Godelle, C. Raquin et P.-H. Gouyon (2002). Aperture pattern ontogeny in angiosperms. *Journal of Experimental Zoology*, 294(2):122–135. doi: 10.1002/jez.10150.
- A. Scoppola et E. Lattanzi (2012). *Viola* section *Melanium* (Violaceae) in Italy. New data on morphology of *Viola tricolor*-Group. *Webbia*, 67(1):47–64. doi: 10.1080/00837792.2012.10670908.
- A. Scoppola et S. Magrini (2019). Comparative palynology and seed morphology in annual pansies (*Viola* sect. *Melanium*, Violaceae): implications for species delimitation. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153(6):883–899. doi: 10.1080/11263504.2019.1610113.
- A. Sicard et M. Lenhard (2011). The selfing syndrome: a model for studying the genetic and evolutionary basis of morphological adaptation in plants. *Annals of Botany*, 107(9):1433–1443. doi: 10.1093/aob/mcr023.
- R. E. Stephens, R. V. Gallagher, L. Dun, W. Cornwell et H. Sauquet (2023). Insect pollination for most of angiosperm evolutionary history. *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.18993.
- M. Thomann, E. Imbert, C. Devaux et P.-O. Cheptou (2013). Flowering plants under global pollinator decline. *Trends in Plant Science*, 18(7):353–359. doi: 10.1016/j.tplants.2013.04.002.
- I. Till-Bottraud, D. L. Venable, I. Dajoz et P.-H. Gouyon (1994). Selection on pollen morphology: a game theory model. *The American Naturalist*, 144(3):395–411. doi: 10.1086/285683.
- I. Till-Bottraud, A. Mignot, R. De Paepe et I. Dajoz (1995). Pollen heteromorphism in *Nicotiana tabacum* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 82(8):1040–1048. doi: 10.1002/j.1537-2197.1995.tb11569.x.
- L. J. Weider, P. D. Jeyasingh et D. Frisch (2018). Evolutionary aspects of resurrection ecology: progress, scope, and applications-An overview. *Evolutionary Applications*, 11(1):3–10. doi: 10.1111/eva.12563.

DE LA CARACTÉRISTIQUE À LA FONCTION :
RÔLE DES TRAITS CONSTITUANT LE SYNDROME D'AUTOFÉCONDATION



MANUSCRIT

III

TRAITS INTERVENANT DANS L'ALLOFÉCONDATION SOUS POLLINISATION LIBRE
CHEZ UNE PLANTE PARTIELLEMENT AUTOGAME :
DIFFÉRENCES ENTRE LES FONCTIONS MÂLE ET FEMELLE



Cet article est pratiquement prêt à être soumis pour publication.



Traits mediating outcrossing in a partially selfing plant under insect pollination: differences in male and female functions

SAMSON ACOCA-PIDOLLE* AND PIERRE-OLIVIER CHEPTOU

CEFE, Univ. Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

*Corresponding author, email address: samson.acoca-pidolle@cefe.cnrs.fr

Abstract

- In angiosperms, mating implies a tripartite interaction between sexual partners and a pollinator. In absence of pollinator, many species possess the capacity to self-fertilize. Evolution toward selfing is associated to the evolution of a set of floral traits, constituting the selfing syndrome. Some traits of this syndrome are likely mediating interaction with pollinators, and some are likely not considered by the pollinator (blind for pollinators). The aim of this study is to test the role of the floral traits in the occurrence of selfing, or outcrossing.
- Four pairs of ancestral and descendant populations of *Viola arvensis* in a standard pollination environment, were genotyped and phenotyped. Offspring were also genotyped allowing to measure selfing rate in each population. Paternity assignment, including selfing, allowed to link the number of outcrossed offspring obtained by parents through male and female function to their traits. The offspring generation was also phenotyped and used to test the effects of traits on pollinator behaviors.
- Under standard pollination environment, descendant populations experienced a higher selfing rate than ancestral ones, consistently with the evolution of a selfing syndrome in descendant populations. At the individual level, all tested traits are linked to selfing through at least one sexual function. Number of nectar guides shows concurring effects through the two sexual functions, while mean number of pollen apertures has antagonistic effects. Only floral display has been found correlated to pollinator attraction.
- This study exhibits rapid evolution of selfing propensity. Even traits blind for pollinators can affect outcrossing success. Effects through sexual functions could explain observed pace of trait evolution. Characterizing how selfing syndrome traits are mediating selfing helps to understand the likely irreversibility of this evolution.

Key words: Trait function, pollination, mating interferences, selfing syndrome, context-dependence, evolutionary reversibility, *Viola arvensis*

Introduction

The flower is the site of the sexual reproduction of the angiosperms. It is an exceptional structure with a combination of vegetative and reproductive organs. Vegetative organs, sepals and petals, are often conspicuous, present a huge diversity of shape and color and many flowers also produce fragrance and rewards, such as nectar. These traits are likely the result of the long interaction between angiosperms and pollinators (van der Niet and Johnson, 2012; Stephens et al., 2023). The flower constitutes resources for the pollinator, while the pollinator transfers pollen grains from anther to stigma, allowing pollination. Most angiosperms are hermaphrodites, thus have both male and female organs in the same plant and even often grouped together within flowers (Barrett, 2010; Iqic and Kohn, 2006). Hermaphroditism allows self-fertilization (selfing) and around 50% of angiosperm species can self-fertilize to some extent (Iqic and Kohn, 2006). Despite pollinators could mediate selfing, such as geitonogamy or facilitated selfing, this is seldom advantageous and unlikely selected (Lloyd, 1992). In contrary, autonomous selfing is often advantageous and observed (Lloyd, 1992; Lloyd and Schoen, 1992).

It has been well described that selfing species possess a particular set of floral traits, such as small, unobspicuous, non-odorous, unrewarding flowers with low pollen:ovule ratio, called selfing syndrome (Ornduff, 1969; Cruden, 1977; Sicard and Lenhard, 2011). The evolution toward selfing and the associated selfing syndrome is even considered as one of the most common evolutionary transitions in angiosperms (Barrett, 2010). Despite the general acceptance that small inconspicuous flowers favor selfing, few studies explored the functional link between selfing syndrome traits and selfing (Sicard and Lenhard, 2011). Selfing syndrome has mainly been described by comparing closely related species, one almost completely selfing and one obligately outcrossing (Foxe et al., 2009; Sicard and Lenhard, 2011). However, experimental evolution and comparison of natural populations of mixed mating species also reported some ongoing development of the selfing syndrome (Bodbyl Roels and Kelly, 2011; Brys and Jacquemyn, 2012; Acoca-Pidolle et al., 2024).

Mating is the interaction between two sexual partners, one male (pollen in angiosperms) and one female (ovule), but animal pollination has the particularity to be a ménage à trois with the pollinator as a third partner. Traits linked to selfing can thus be assigned to two categories, traits which modulate the selfing while modulating the interaction with pollinators (likely floral display or floral guides), and traits that do not, which we will call "blind for pollinators" (likely self-compatibility, herkogamy, pollen:ovule ratio). These two categories are likely suffering different selective pressures during selfing evolution, as suggested by the study of Bodbyl Roels and Kelly (2011) were herkogamy evolved in link with the increase of selfing ability in absence of pollinators, while corolla width do not despite its higher heritability. These differences are raising the questions of the sequence and timing of evolution of traits constituting the selfing syndrome and dissecting the link between traits and mating system would help to answer these questions (Sicard and Lenhard, 2011; Kelly, 2024).

Even if autonomous selfing implies a single individual, it still implies two sexual functions, the male function (pollen export) and the female function (pollen import). Given that a single pollinator visit provides sufficient pollen deposition to fertilize most of ovules but exports only a fraction of pollen of the flower, the hypothesis that flower has mainly a male function has been proposed (Bell, 1985). Indeed, in this case multiple visits are more beneficial to male function than to female function. However, the number of visits is not sufficient to explain trait functions and visit efficiency should be integrated to

link pollinator behaviors to trait functions (Campbell et al., 1991; La Rosa and Conner, 2017). Thus, the male function hypothesis has been widely discussed, criticized and other theories have been proposed (Campbell, 1989; Wilson et al., 1994; Morgan and Schoen, 1997; Burd and Callahan, 2000; Ashman and Morgan, 2004). The floral traits could, of course, have a female function or simultaneously mediate the two sexual functions, potentially antagonistically (Morgan and Schoen, 1997). To our knowledge, all the studies of floral trait functions only consider complete outcrossing and no study has examined the male and female functions of traits for the realization of selfing (e.g., Bell, 1985; Campbell, 1989; Galen, 1989; Campbell et al., 1991; Morgan and Schoen, 1997; Benitez-Vieyra et al., 2006; La Rosa and Conner, 2017).

When thinking to the function of a trait, the following question can emerge: is the trait function dependent of its context? Indeed, trait function can be dependent on the trait value relative to trait values of other conspecifics. If the function of the trait is related to fitness, it will experience soft selection in this case (Wallace, 1975). It can be the case if the trait mediate competition between individuals for a finite number of cross-fertilization events due to limited number of pollinators. On the contrary, when only the absolute trait value influences the trait function, independently of other conspecifics, the trait could be under hard selection (Wallace, 1975). For example, a trait favoring autonomous selfing, rendering individuals independent of cross-pollination, can be under hard selection in an environment depauperated in pollinators. This question of context dependency of the trait function has rarely been assess, whereas it could have important ecological consequences (Bell et al., 2021). Under soft selection, the population is held constant, the fraction of individual with the selected trait values contributes just to a higher fraction of offspring than others (Bell et al., 2021). Under hard selection, the population may suffer decline because only individuals with the selected trait values could reproduce (Bell et al., 2021). Looking at the selective type is especially relevant regarding plant evolutionary rescue potential in the context of global change, and of pollinator declines in particular (Potts et al., 2010; Thomann et al., 2013).

Taking advantage of four pairs of ancestral and descendant populations of *Viola arvensis* experiencing ongoing evolution of selfing rates and floral traits (Acoca-Pidolle et al., 2024), this study aims to understand how traits are mediating selfing, or respectively outcrossing, at the population level before dissecting it at the individual level. These populations were phenotyped, exposed to a standard pollination environment and progenies genotyped to answer following questions:

- At the population level, are there differences in selfing rates under standard pollination environment? If yes, are these differences correlated to differences in mean floral traits?
- At the individual level, what traits are involved in outcrossing through male function or female function? Are there traits involved in both sexual functions? If yes, are they antagonist ? Are trait functions dependent on the context? Are trait functions related to pollinator behaviors?

Material and methods

Study system and sampling

Viola arvensis Murray is an annual species of wild pansy (Violaceae). It is commonly found in fields as a weed or in meadows. The species is self-compatible with a mixed mating system (Scoppola and

Lattanzi, 2012; Cheptou et al., 2022; Acoca-Pidolle et al., 2024). The flower possesses a tricarpeal syncarpous ovary, each carpel containing several ovules. The species presents a pollen heteromorphism; a single individual produces, within each anther, different pollen morphs with different numbers of apertures (Till-Bottraud et al., 1995; Scoppola and Magrini, 2019). *Viola arvensis* produces a majority of 5-aperturate pollen grains but can also produce 4- and 6-aperturate morphs (Scoppola and Magrini, 2019; Acoca-Pidolle et al., submitted).

Following a resurrection ecology protocol, plants were sampled twice in agricultural fields in four locations of the Parisian Basin. The first sampling was done by the Conservatoire Botanique National de Bailleul for Crouy (Cr; 49°24'24.31"N, 3°22'20.73"E) and Lhuys (Lh; 49°16'35.40"N, 3°32'58.52"E) in the 1990s and by the Conservatoire Botanique National du Bassin Parisien for Commeny (Co; 49°7'37.11"N, 1°53'46.30"E) and Guernes (Gu; 49° 1'10.75"N, 1°38'46.82"E) in the 2000s. Seeds were collected by sampling fruits on a minimum of 100 mothers picked randomly in each population. The second sampling was performed in exactly the same locations, in an area that overlapped the ancestral sampling area as much as possible, in February 2021 by randomly sampling 40 or more seedlings. The minimal sampling area was of 2,000 m² and corresponds to a case where all the population is circumscribed on this area. This sampling scheme produced four pairs, one for each location, of ancestral (A) and descendant (D) populations, thus eight populations in total.

Experimental design

The parental generation was grown in common garden with plants (ancestral and descendant) originated from the field. As ancestral populations were stored seeds and descendant ones were collected at seedling stage in the field, common conditions started at seedling stage. For ancestral populations, in mid-November 2020, seed lots were placed in germination chambers in Petri dishes with vermiculite under light at 15°C for 12h and in the dark at 6°C for 12h. Germination rates were of 50% to 65%. 32 seedlings of ancestral and descendant populations were transplanted in late February 2021 in the field of the Baillarguet site of the experimental platform "Terrains d'Expériences" of the Labex Cemeb, 10 km north of Montpellier, France (43°40'53.92"N, 3°52'28.74"E). Populations were separated in insect-proof mesh cages of 290 × 180 cm². During full blooming, in mid-April, commercial bumblebee hives (Natupol, Koppert France®) were introduced into the cages to produce open-pollinated fruits. Thus, each cage had the same insect pollination environment. From one to three fruits per individual produced in this pollination context were collected and mixed into a single batch of seeds. Three events of mortality were observed before exposition to pollinators in CrD and one in LhD populations.

The collected seeds produced by the parental generation were used to grow the offspring generation. 20 mother plants per population in the parental generation were randomly selected to construct 20 families. In December 2021, 30 seeds per family were placed in germination chambers in Petri dishes with vermiculite under light at 15°C for 12h and in the dark at 6°C for 12h. Germination rates per population range between 75% and 90%. In each family five seedlings were selected to establish families composed of five siblings. Three families did not germinate enough to obtain five plants and thus were composed of one, two and four siblings. Therefore, 793 progenies were grown from 160 mothers and 252 fathers.

Individuals used in this study are the same as those used in the previous study of Acoca-Pidolle et al. (2024) with the parental population corresponding to the F0 generation and the progenies being

the F1 generation.

Genotyping, selfing rate estimation and paternity assignment

A fresh leaf was collected in all the plants in parental and offspring generations for genotyping. DNA was extracted using Dneasy Plant Mini Kit from QIAGEN® directly from fresh leaves for parental generation and from leaves conserved in coffee filters with silica gel for progenies. The 252 parental plants and 784 of the 793 progenies were genotyped after double-reading of eleven microsatellite markers, 6 designed for *Viola arvensis* (Cheptou et al., 2022) and 5 designed on *Viola tricolor* (Latron et al., 2018), a closely related species (Scoppola and Lattanzi, 2012).

Selfing rate estimations were performed using the MLTR program (Ritland, 2021) specifying families and mother genotypes. This software allows to estimate single and multilocus-based selfing rates jointly, which allows to estimate biparental inbreeding (Shaw et al., 1981; Ritland, 2002). If single and multilocus-based selfing rates are equal together, biparental inbreeding is negligible, otherwise, multilocus-based estimate is less sensitive to biparental inbreeding. Standard deviations were calculated from 100 bootstraps on entire families.

Given low allelic diversity of loci within parental populations (2.7 alleles per loci per population in average, with some monomorphic loci), paternity assignment was challenging, and mistyping (including misreading, mistyping, or mutation) was assumed unlikely. The 784 progenies were firstly manually checked and assigned to a selfing event if their genotype can be obtained pairing two maternal haplotype. By this way, population selfing rates obtained were very close to those estimated using MLTR program (Table 1), which indicate that the selfing assignment was correct. Second, manual assignment of putative fathers for the 95 progenies produced by outcrossing, considering no mistyping, was performed. 39 progenies for which a single putative father was found have been directly assigned to this father. Third, remaining progenies were assigned using CERVUS software (Kalinowski et al., 2007). Populations were analyzed one by one. Allelic frequencies were calculated using parental genotypes, then paternity assignment simulations were performed on 10 000 offspring given 32 candidate fathers representing 100% of candidate fathers, 95% of loci typed, 0.5% mistyping error, and a minimum of 7 loci typed. When the most likely father was unambiguous, this father was assigned, which was the case for 28 progenies. For three progenies, with two most likely fathers, one implies mistyping, in these three cases the father implying no mistyping was assigned. At the end, 70 paternities among the 95 outcrossing progenies were assigned following this procedure, so 25 remained unassigned. The 70 paternities were distributed among 43 fathers.

Floral trait measurements

In the parental generation, a maximum of three flowers were monitored simultaneously per plant by labelling flowers with a color mark on the pedicel and checking them on Mondays, Wednesdays, and Fridays from the beginning of the pollination mid-April to the end mid-May 2021. On an average of 12 flowers per plant (SD = 6), anthesis duration and minimum three days after anthesis, labellum width, corolla length and number of floral guides were measured. Labellum width and corolla length measured with a digital caliper (to the nearest 0.01 mm) were highly correlated ($r = 0.79, P < 0.001$), and thus summarized by multiplying them to obtain a floral area approximation (correlated to more than 0.93

with the two original traits) used in the following analyses. During each survey, the number of opened flowers per plant was counted. These measurement sequences were integrated using trapezoidal rule between the beginning of the measurement and the last day of measurement, giving the average floral display.

In order to measure pollen and ovules traits, one bud close to anthesis per plant was collected and frozen at -20 °C in a labelled tube within 2 days in May 2021. Buds were defrosted and dissected in July and August 2023. Under binocular magnifier, one of the five anthers was dilacerated in a drop of lactic acid on a microscope slide and then the three morphs of pollen grains (4-, 5-, or 6-aperturate) were counted under microscope using a mounted bank of three counters. The ovary was isolated, incised under binocular magnifier and ovules were manually counted. The pollen:ovule ratio was calculated by multiplying the number of pollen grains contained in one anther by five to obtain a flower-wide estimate, divided by the number of ovules. Given the correlation of total pollen amount with ovule number ($r = 0.51, P < 0.001$) and pollen:ovule ratio ($rr = 0.55, P < 0.001$), only ovule number and pollen:ovule ratio moderately correlated ($r = -0.44, P < 0.001$) were kept in following analyses. The mean number of apertures was calculated by multiplying frequencies of morphs by the number of apertures they exhibit.

Pollinator behavior observation

Offspring plants were exposed to pollinators to perform a preference test. In two insect-proof mesh cages, a commercial bumblebee (*Bombus terrestris*) hive (Natupol, Koppert France®) of around 30 workers with a queen and with nutrient reserves was placed for the entire experiment. 20 plants from the same location, composed of 10 plants from each ancestral and descendant populations, randomly selected, were randomly arranged in one of the two insect-proof cages. Pots were equally spaced at 35 cm. The observer, stationed in the entrance of the insect-proof cages, selected a foraging worker bumblebee, and recorded the sequence of flower visitation during 10 to 15 minutes. Cage number (1, 2), position in the cage (1-20) and plant identities were also recorded. Experiments were performed between 2 and 19 May 2022. The experiment was performed on 8 groups for each locality but just 6 and 7 observations were kept for Lhuys and Crouy respectively, because worker bumblebees foraged less than 10 minutes in the discarded observations. Of the 580 plants in the dataset, 3 individuals were exposed two times to reach the 20 individuals per observation. During a 10-15 minutes test, 4.28 plants were not visited on average and 124 in total for all the tests. In the analyses, plants visited and unvisited were sorted out (see below). The proportion of visit per plant was calculated as the ratio between the number of visits on a given plant divided by the total number of visits during a flight. Fidelity to the plant calculated as the proportion of visits who was preceded by a visit on the same plant was used to approximate the potential for geitonogamy.

Offspring generation was also phenotyped using the similar methods to the parental generation. The five first flowers of the main stem were monitored every working day and measured two or three days after anthesis. Floral display was recorded continuously but the last record of floral display before exposure to pollinators (measured maximum 10 days before exposure) was used, setting floral display to a minimum of one flower which was a pre-requisite for exposure. One bud close to anthesis per plant was collected and frozen at -20 °C in a labelled tube between 26 April and 12 May 2022, only in the main stem. 16 months after collection, in September and October 2023, buds were defrosted and dissected

using procedure described for the parental generation (see above), except that another experimenter dissected and counted ovules while pollen grains were counted by the same experimenter. Because relative attractivity was tested while looking at the proportion of visit, traits were standardized within each group exposed to pollinators to represent the context variations (similar to context-dependent model, see below).

Statistical analyses

Repeated floral measures were averaged to obtain a unique measure at the individual level. The differences in trait values between populations, given the ancestral or descendant status, have been the subject of analyses in other studies and therefore are not presented in this article (Acoca-Pidolle et al., 2024; Acoca-Pidolle et al., *submitted*). To test correlation between population selfing rates and traits, traits were averaged within each population.

For each parental plant, the number of outcrossed progenies as dam (constrained between 0 and 5 given the number of progenies by family, following a binomial law) and the number of outcrossed progenies as sire (following a Poisson law) were recorded, corresponding to the female and the male function respectively. A univariate generalized linear mixed model (GLMM) was performed in each trait (floral area approximation, number of nectar guides, anthesis duration, average floral display, ovule number, pollen:ovule ratio and mean number of apertures) with the number of outcrossing progenies as sire or as dam as dependent variable, trait as fixed effect and population, which encompasses block effect, as random effect. A multivariate GLMM was also performed with the seven traits as fixed effects and population as random effect to test multicollinearity. Given the inability to fully assign paternity, the number of outcrossed progenies as sire of up to 25 individuals is underestimated. However, paternity assignments are assumed randomly distributed according to phenotypic traits, which would affect intercept and likely reduce estimates.

To test if the trait function is dependent or not on the context, corresponding to soft or hard selection respectively (Wallace, 1975; Bell et al., 2021), the individual trait dataset was duplicated and each version conducted to an analysis with the model structure presented above, referred after as context-dependent or context-independent models respectively. For the context-independent model dataset, trait values were standardized pulling all the individuals of all the population together, giving absolute trait values. While in the context-dependent model dataset, trait values were standardized within each population, giving relative trait values. The difference between the two standardizations is presented for anthesis duration in **Figure 1A & B**. Standardization was necessary in both models to compare effect size of traits between them. In the context-independent model dataset, the trait value is dependent on the distribution of the trait through all the populations, allowing to test trait function in a hard selection context (**Figure 1C** Bell et al., 2021). In the context-dependent model dataset, where traits are standardized within each population, the individual trait value is dependent on trait values present in the population, allowing to test trait function in a soft selection context (**Figure 1D** Bell et al., 2021). To distinguish between context-dependent and context-independent model, variance between populations should be higher than within population, leading graphically to non-overlapping distributions of trait in each population. Differences measured among populations for several traits (not analyzed here, but see Acoca-Pidolle et al., 2024; Acoca-Pidolle et al., *submitted*) result in two datasets not entirely equivalent. Mean aperture and pollen:ovule ratio are the traits presenting the least variation among

populations and therefore the higher correlation between the two datasets, limiting the power to clearly assess if their functions are context-dependent or not, although this is also the case to a lesser extent for other traits.

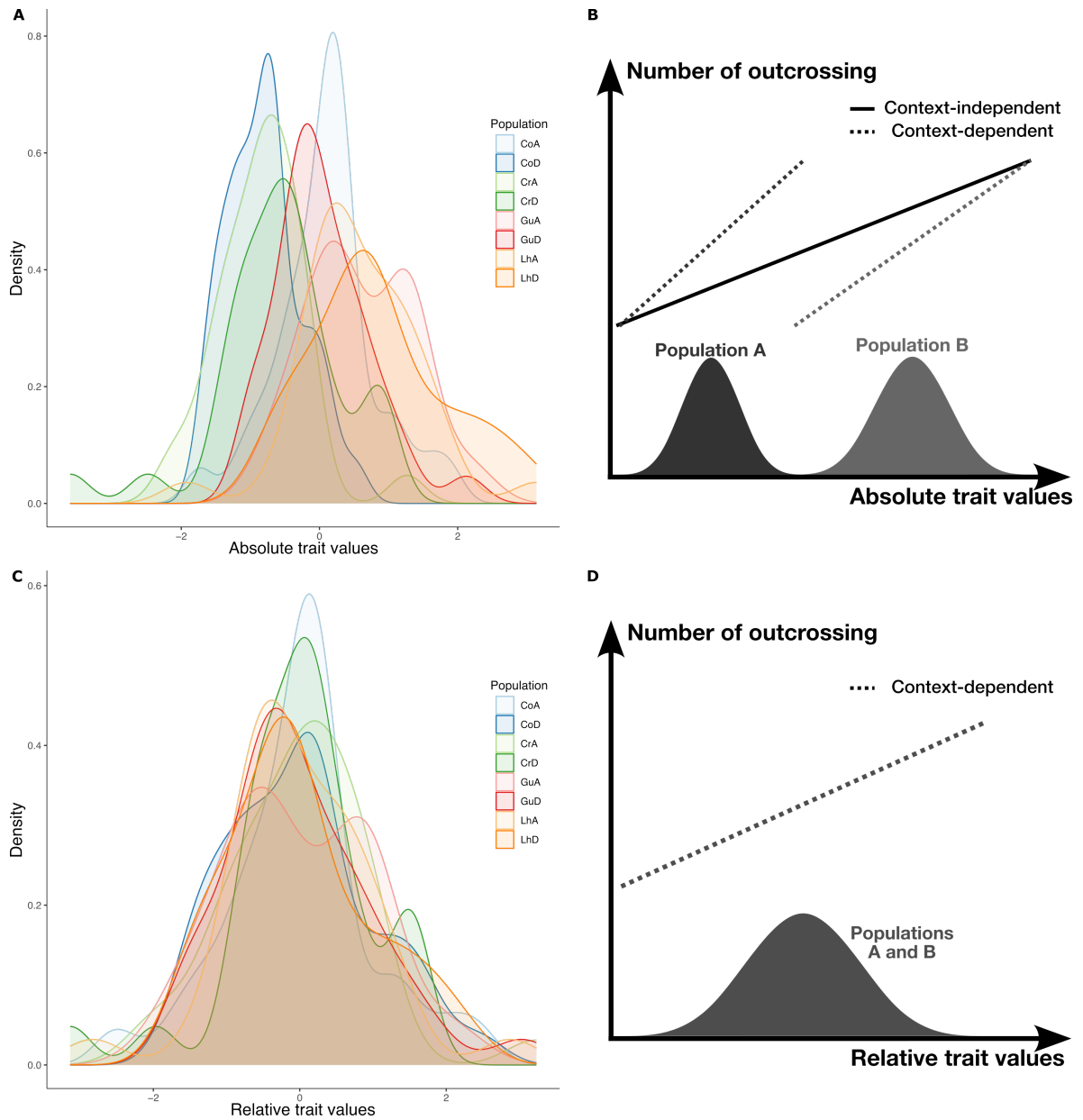


Figure 1: Trait value distributions in each population in context-dependent or context-independent models (A & B) Distribution of anthesis duration in the 8 populations used in the context-independent and context-dependent models. In context-independent model (A), traits are standardized regardless of the population, therefore individuals which possess the highest trait values overall the populations still have it (absolute trait values), while in context-dependent model (B) traits are standardized within each population, therefore individuals which possess the highest traits of their population will have the highest trait values even if some individuals in some other population have higher trait values (relative trait values). (C & D) Presentation of the differences between a function that is context-independent and context-dependent. Using absolute trait values allows to test context-independent effects of the trait (C), while using relative trait values, the two population distributions and fitness curves are superimposed, allowing to test context-dependent effects (D). The population first two letters are the name of the locality (Co = Commeny; Cr = Crouy; Gu = Guernes; Lh = Lhuys), "A" for ancestral (collected in 2000 for Co, 1993 for Cr, 2001 for Gu and 1992 for Lh) and "D" for descendant (all collected in 2021).

Effects of floral traits in pollinator attractivity were tested on each trait using a two-step analysis. First, the probability of receiving at least one visit (following a Bernoulli law) was modeled using a GLMM with trait as fixed effect and observation date, population, family nested within population, cage number, and position inside the cage nested within cage number as random effects. Secondly, after sorting out unvisited plants, the proportion of visits an individual received was modeled using a linear mixed model (LMM) with the same structure as the GLMM. Finally, the proportion of visits a flower of an individual received (proportion of visits per individual divided by the number of open flowers) was modeled using a LMM with floral display as fixed effect and the same random effects as before. For visited plants, the plant fidelity, which is the number of visits consecutive to a visit to the same plant (following a binomial law), was also modeled using a GLMM with trait as fixed effect and the same structure of random effects as other models.

All the statistical analyses were performed using the R software (R Core Team, Version 4.2.1). LMMs and GLMM were performed using the "lmer" and "glmer" functions implemented in the package LME4 (Bates et al., 2015).

Results

Population selfing rates

The selfing rate estimates are between 0.78 and 0.98 (**Table 1**). Selfing rates are similar using single- or multilocus estimates, with a maximum difference of 0.04 (**Table 1**). Importantly, there is an increase of approximately 0.1 in selfing rates between ancestral and descendant populations in all the localities (**Table 1**). Selfing rates also differ between localities with the lowest selfing rate, for ancestral and descendant populations, in Lhuys.

Table 1: Selfing rate estimates (SD) during exposition to pollinators

Selfing rates are estimated using the MLTR program on eleven microsatellites genotyped for the entire parental population and 20 families of five offspring per population. Standard deviations are based upon 100 bootstraps on entire families. Fraction of manually assigned selfed offspring is the number of offspring manually assigned to a selfing event over the total number of offspring investigated. The population first two letters are the name of the locality (Co = Commeny; Cr = Crouy; Gu = Guernes; Lh = Lhuys), "A" for ancestral (collected in 2000 for Co, 1993 for Cr, 2001 for Gu and 1992 for Lh) and "D" for descendant (all collected in 2021).

Population	CoA	CrA	GuA	LhA
	CoD	CrD	GuD	LhD
Singlelocus selfing rate estimate	0.889 (0.057)	0.916 (0.031)	0.870 (0.041)	0.828 (0.060)
	0.983 (0.010)	0.952 (0.029)	0.952 (0.028)	0.911 (0.032)
Multilocus selfing rate estimate	0.855 (0.057)	0.860 (0.040)	0.826 (0.047)	0.780 (0.066)
	0.979 (0.014)	0.949 (0.027)	0.917 (0.047)	0.869 (0.044)
Fraction of manually assigned selfed offspring	80/93 = 0.86	87/100 = 0.87	82/99 = 0.83	75/98 = 0.77
	94/98 = 0.96	93/98 = 0.95	93/99 = 0.94	86/99 = 0.87

The only floral trait significantly correlated to selfing rate at the population level is pollen:ovule ratio ($r = -0.89, P = 0.003$, **Figure 2**). Anthesis duration, number of nectar guides, floral area, and floral display are also, but not significantly, negatively correlated to selfing rate ($r = -0.67, P = 0.07$; $r = -0.57, P = 0.14$; $r = -0.48, P = 0.22$; $r = -0.42, P = 0.3$, respectively).

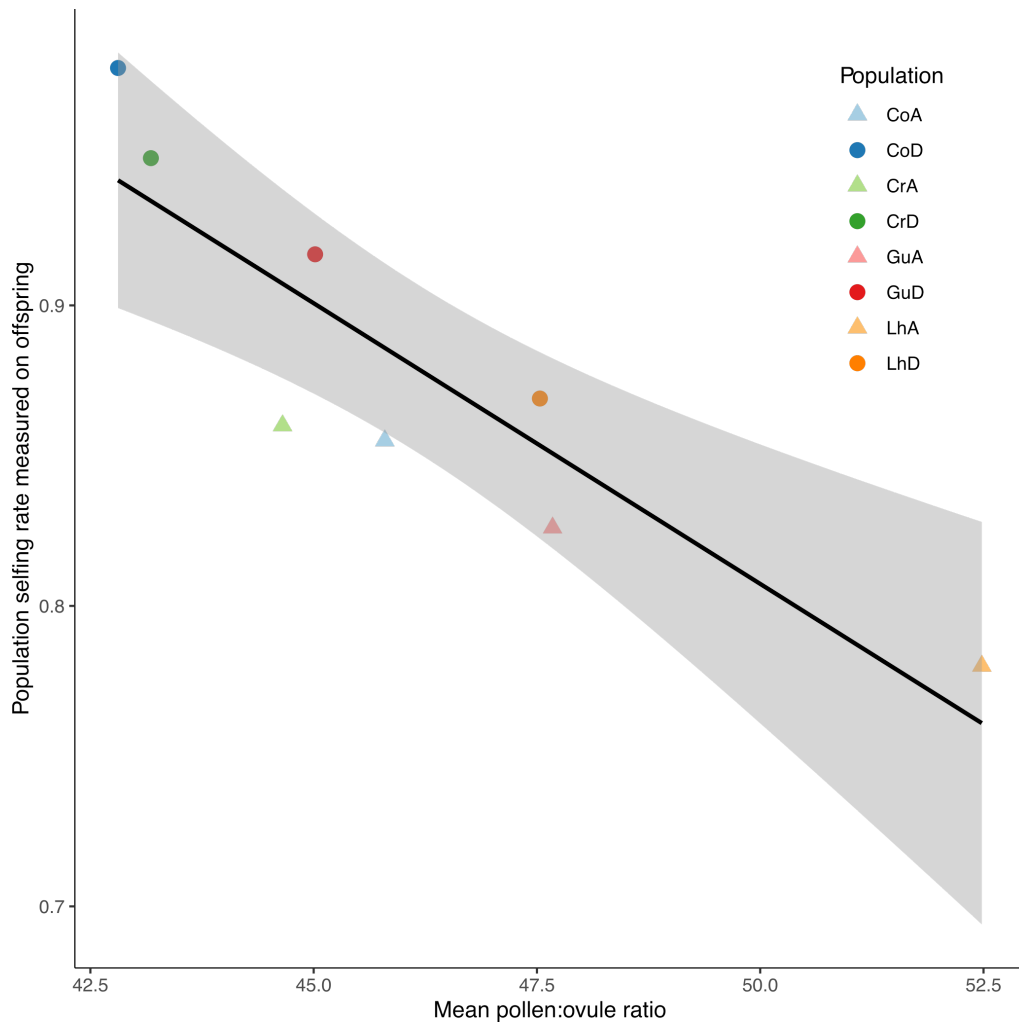


Figure 2: Correlation between population pollen:ovule ratio and selfing rates

Selfing rates are estimated using the MLTR program on eleven microsatellites genotyped for the entire parental population and 20 families of five offspring per population. Pollen:ovule ratios were measured on a single bud per plant and averaged on the 32 plants of each population. The black line corresponds to the linear regression with the 95% confidence intervals in shaded gray. The population first two letters are the name of the locality (Co = Commeny; Cr = Crouy; Gu = Guernes; Lh = Lhuys), "A" (▲) for ancestral (collected in 2000 for Co, 1993 for Cr, 2001 for Gu and 1992 for Lh) and "D" (●) for descendant (all collected in 2021).

Effects of floral traits on selfing at the individual scale

First, outcrossing events were looked for facilities, a trait affecting the number of outcrossing events affects the number of selfing events in the opposite way. All the measured traits are linked to the number of outcrossing events by at least one of the two sexual functions, male function (pollen export) or female function (pollen import), regardless of whether context-dependent or context-independent model was used (Table 2, Figures 1 & 3). Second, results between univariate and multivariate analyses are consistent, exception made of floral area for male function, and number of ovules and pollen:ovule ratio for female function (Table 2). In multivariate analyses, floral area no longer significantly increases the male outcrossing, number of ovules no longer significantly decreases the female outcrossing, and pollen:ovule ratio no longer significantly increases the female outcrossing (remaining marginally significant in context-independent model, Table 2).

Table 2: Effects of floral traits on pollen export or import

In eight populations of 32 plants in open pollination, all the parents and 5 progenies per chosen mother (20 per population) were genotyped. 95 progenies were outcrossed among which 70 had an assigned paternity allowing to record the number of outcrossing for each parent. Statistical analyses were performed using GLMMs with trait as fixed effect and population as random effect. Multivariate analysis consists in a single GLMM with all the traits as fixed effect and population as random effect. All the values are standardized to allow comparison of estimates between traits. In context-independent model, trait values are standardized through all the measures taken, while in context-dependent model, trait values are standardized within the population in which they were exposed to pollinators.

Trait	Number of outcrossing as sire					Number of outcrossing as dam				
	Univariate analyses		Multivariate analyses (N = 248)			Univariate analyses		Multivariate analyses (N = 158)		
	N	Estimate	P	Estimate	P	N	Estimate	P	Estimate	P
Context-independent model										
Floral area approximation	251	0.298	0.008	0.061	0.692	160	0.197	0.115	0.021	0.892
Number of nectar guides	251	0.513	0.007	0.584	0.014	160	0.674	< 0.001	0.559	0.011
Anthesis duration	252	-0.072	0.614	-0.254	0.126	160	0.545	< 0.001	0.429	0.007
Average floral display	252	0.627	< 0.001	0.634	< 0.001	160	-0.158	0.216	-0.184	0.174
Number of ovules	249	-0.019	0.894	0.114	0.496	158	-0.333	0.012	-0.100	0.551
Pollen:ovule ratio	248	0.105	0.427	0.173	0.230	158	0.476	< 0.001	0.265	0.082
Mean number of apertures	248	0.365	0.014	0.469	0.002	158	-0.418	< 0.001	-0.385	< 0.001
Context-dependent model										
Floral area approximation	251	0.286	0.009	-0.032	0.831	160	0.112	0.304	0.021	0.888
Number of nectar guides	251	0.166	0.184	0.189	0.194	160	0.554	< 0.001	0.561	< 0.001
Anthesis duration	252	-0.137	0.264	-0.162	0.274	160	0.383	< 0.001	0.339	0.014
Average floral display	252	0.616	< 0.001	0.662	< 0.001	160	-0.200	0.084	-0.226	0.088
Number of ovules	249	0.038	0.751	0.073	0.609	158	-0.267	0.017	-0.205	0.131
Pollen:ovule ratio	248	0.015	0.899	0.066	0.637	158	0.305	0.007	0.120	0.393
Mean number of apertures	248	0.343	0.016	0.424	0.004	158	-0.405	< 0.001	-0.475	< 0.001

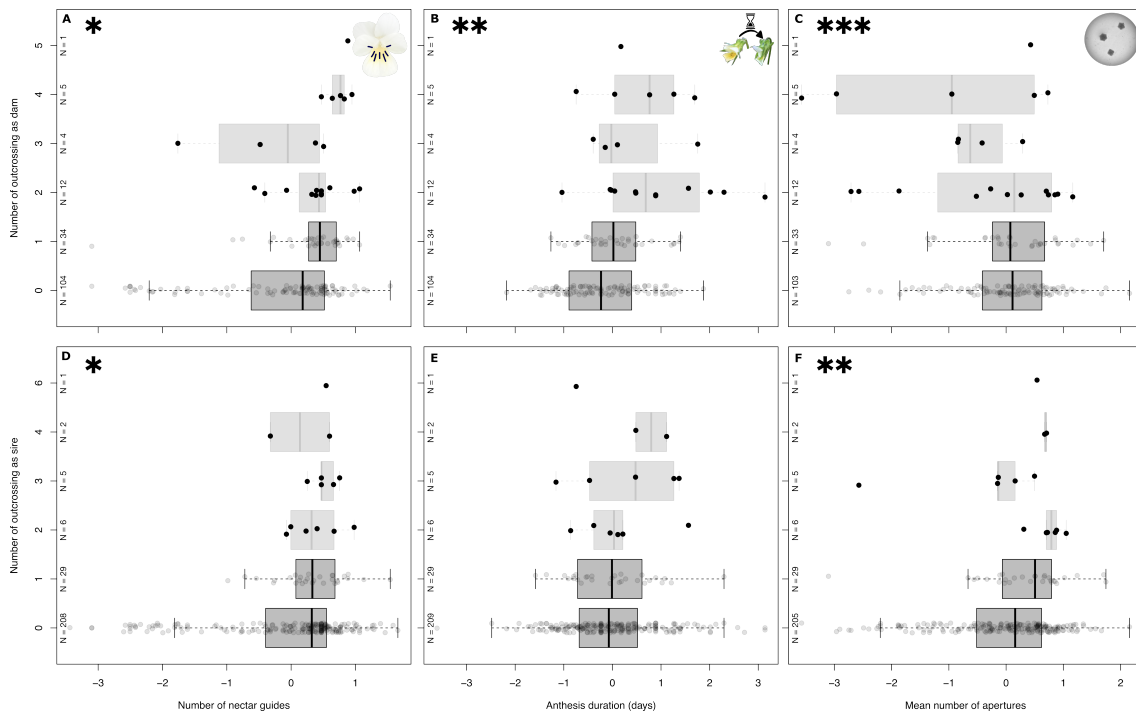


Figure 3: Traits influencing pollen import and export

(A, B, C) Number of outcrossing as dam and (D, E, F) as sire in function of (A,D) number of nectar guides, (B, E) anthesis duration, and (C, F) mean number of apertures. In eight populations of 32 plants in open pollination, all the parents and 5 progenies per chosen mother (20 per population) were genotyped. 95 progenies were outcrossed among which 70 had an assigned paternity allowing to record the number of outcrossing for each parent. Number of nectar guides and anthesis duration were measured repeatedly on an average of 12 flowers per parent, and then averaged by individual. Mean number of apertures was calculated by averaging the number of pollen grains of each aperture morph counted manually on one non-dehiscent anther per parent. In this figure, traits are standardized across all the population and statistics correspond to multivariate analyses ($P < 0.05$: *, $P < 0.01$: **, $P < 0.001$: ***, see Table 2).

Regardless of the model or analyses, equal number or more measured traits are affecting female outcrossing than male outcrossing. The trait responsible of this pattern is anthesis duration consistently favoring female outcrossing while unaffected male outcrossing (Figure 3B and E, Table 2). Using context-independent model, only two traits affect both functions, the mean number of apertures and the number of nectar guides (Figure 3A, D, C, and F). Nectar guides are concurring in both sexual

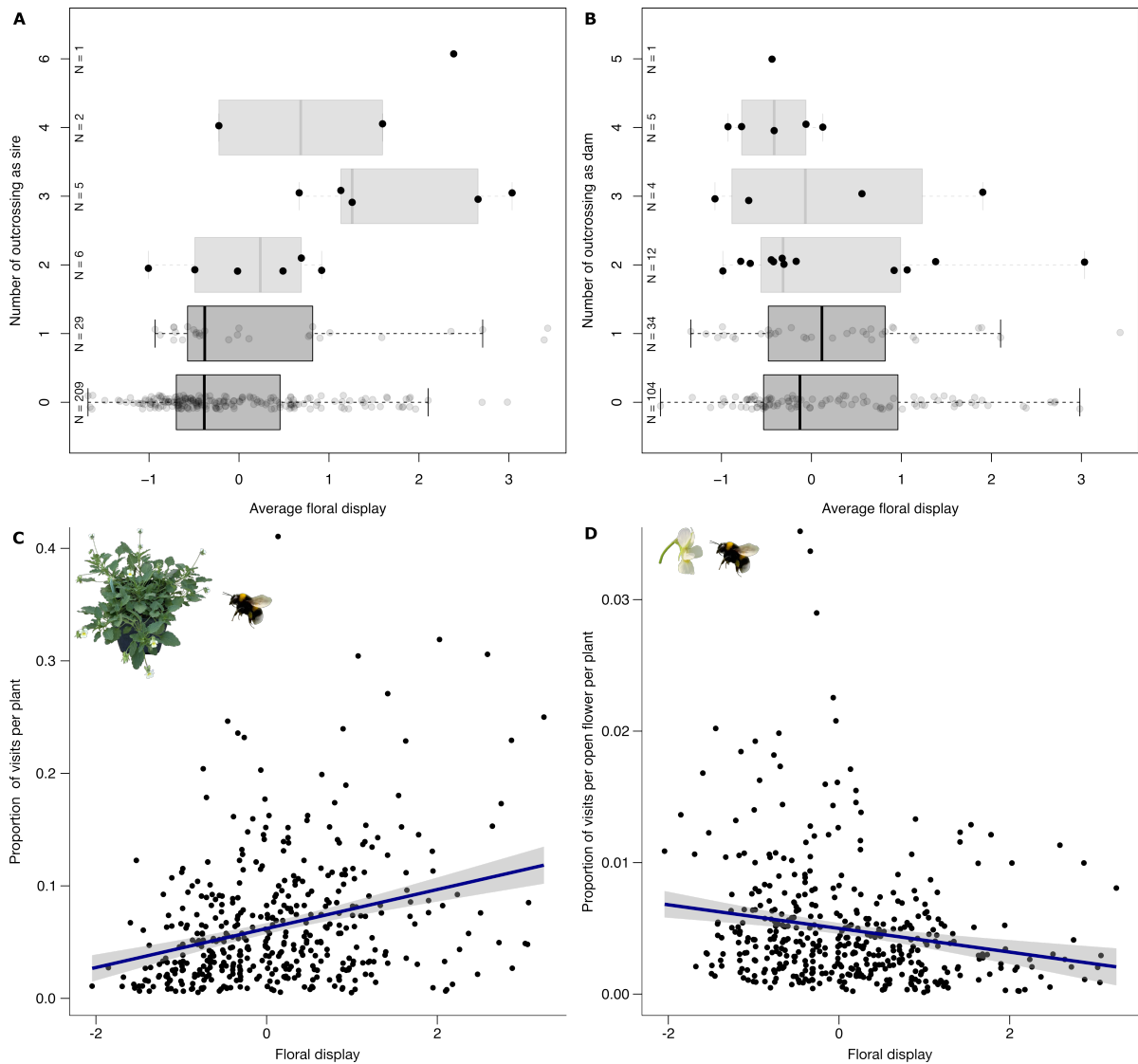


Figure 4: Effect of floral display in pollen export and pollen import, and relation to pollinator behavior

(A) Number of outcrossing as sire and (B) as dam in function of the average floral display. In eight populations of 32 plants in open pollination, all the parents and 5 progenies per chosen mother (20 per population) were genotyped. 95 progenies were outcrossed among which 70 had an assigned paternity allowing to record the number of outcrossing for each parent. The average floral display corresponds to repeated measures on parents of the number of open flowers per plant, integrated over the pollination period using trapezoidal rule, standardized within each population (see Table 2 for statistics). (C) Proportion of visits by pollinators per plant or (D) per open flower per plant in function of the floral display. Only visited plants are represented. Offspring plants were exposed by group of 20 from the same locality (10 ancestral, 10 descendant) to pollinators. Following a bumblebee 10 to 15 minutes, the number of visits on each plant was recorded and divided by the number total of visits to obtain the proportion of visits. A unique measure of floral display has been taken from the same day to 10 days before exposure to bumblebees and standardized within tested group. The blue lines correspond to the linear regressions with the 95% confidence intervals in shaded gray (see "Results" for statistics).

functions, favoring the number of outcrossing events (**Figure 3A and D, Table 2**), contrary to the mean number of apertures which has antagonistic effects, favoring male while disfavoring female outcrossing (**Figure 3C and F, Table 2**). Using context-dependent model, the number of nectar guides no longer favors male outcrossing while the mean number of apertures has the same effects as precedent, and average floral display is marginally significantly disfavoring female outcrossing and strongly favoring male outcrossing (**Figure 4A and B, Table 2**). Also, estimates for anthesis duration and pollen:ovule ratio effects on female outcrossing are higher using context-independent than context-dependent model (**Table 2**).

Relationships between floral traits function and pollinator behavior

Among measured traits, only floral display significantly affects the probability of receiving at least one visit (estimate = 0.596, $P < 0.001$) and the proportion of visits per plant (estimate = 0.017, $P < 0.001$; **Figure 4C**). However, the proportion of visits per flower per plant is negatively affected by the floral display (estimate = -0.001 , $P < 0.001$; **Figure 4D**). This deficit of visit per flower is the consequence of a slower increase in the number of visits per plant with floral display than the floral display itself.

Concerning plant fidelity, the proportion of visits per plant consecutive to a visit to the same plant is 57% in average, with a mean of 3.5 consecutive visits to the same plant when it occurs (maximum of 25). The plant fidelity is only positively affected by the floral display (estimate = 0.057, $P = 0.028$), other traits do not impact bumblebee fidelity to the plant.

Discussion

This study aimed first at testing the link between traits and selfing in populations experiencing ongoing evolution of a selfing syndrome. The second goal was to understand which traits are mediating outcrossing at the individual level and through which sexual function. The last objective was to link this function of traits to pollinator behaviors.

There are differences in selfing rates among the eight populations even under standard pollination environment. Descendant populations have higher selfing rates than ancestral ones, consistently with selfing rate realized in the field (Acoca-Pidolle et al., 2024). This increase in selfing rates, under standard pollination environment, is the signature of the evolution of mating system. The high selfing rates, compared to the rates measured in the field (Acoca-Pidolle et al., 2024), suggest low cross-pollination efficiency by bumblebees, which can result from geitonogamy, permitted by the high plant fidelity of bumblebees also observed by Bodbyl Roels and Kelly (2011), or of facilitated selfing (Lloyd and Schoen, 1992). Despite the associated evolution of several attractive traits (Acoca-Pidolle et al., 2024), none of these are significantly correlated to selfing rate. At the population level, the only trait significantly negatively correlated to selfing rate is pollen:ovule ratio, which captures temporal and spatial variations of selfing rates. Harder and Johnson (2023) found a similar but very weak correlation at the species level between pollen:ovule ratios and outcrossing rates. This difference in explanatory power of selfing rate by pollen:ovule ratio could be due to measurement made in various versus standardized pollination environments.

At the individual scale, all the measured traits are significantly associated to outcrossing (or selfing in the opposite way) through at least one sexual function. Only the number of nectar guides favors male

and female outcrossing. While mean number of apertures and average floral display favor outcrossing via male function and disfavor outcrossing via female function, only marginally for average floral display. Some traits present differences between context-dependent and context-independent models. The number of nectar guides no longer favors male outcrossing using context-dependent model. To a lesser extent, anthesis duration and pollen:ovule ratio favors more female outcrossing with absolute than relative trait values. Finally, pollinator visit behavior is only affected by the floral display. The more open flowers a plant exhibits, the more visits it receives, however, each open flower has less chance to be visited given that the number of visits increases slower than the number of open flowers.

Floral traits modulating selfing through pollinator behavior

First, all the measured traits are significantly associated to the number of selfing events through at least one sexual function. However, floral area for male outcrossing, and ovule number and pollen:ovule ratio for female outcrossing are no longer significant in multivariate analyses. These differences indicate the presence of collinearity among the variables likely due to genetic correlation of traits resulting of the selfing syndrome evolution (Goodwillie et al., 2010; Sicard et al., 2011).

Concerning traits mediating plant-pollinator interaction *a priori* (floral area, number of guides, anthesis duration, and floral display), most traits act either as male or female, consistently with other studies (Ashman and Morgan, 2004; Delph and Ashman, 2006). The only trait that favors male and female outcrossing is the number of nectar guides. However, this effect differs between sexes depending on the model. Although female outcrossing is favored at similar level considering context-dependent and context-independent models, male outcrossing is only favored considering context-independent model, suggesting that success of male outcrossing due to nectar guides is independent of other conspecifics traits. Similar context-specific selection has been observed in some studies involving sex ratio (Ashman and Diefenderfer, 2001). Assuming that nectar guide function is mediated through pollinator behavior, we hypothesize that the pollinator efficiency (mostly favoring female function) is increased by the absolute and the relative number of nectar guides facilitating manipulation. In contrast, the pollinator attraction (favoring male function) is only increased by the absolute number of nectar guides. This hypothesis is substantiated by the pollinator behavior experiment testing relative attraction and founding no effect of nectar guides. Therefore, we can imagine that pollinator efficiency or absolute attraction are more relevant for this trait.

The floral display is the trait that has the greatest effect in male outcrossing and a marginally significant effect in female outcrossing in context-dependent model. The increase in male outcrossing with the increase in floral display contradicts results found by Campbell (1989) but is in line with some other studies (Bell, 1985; Benitez-Vieyra et al., 2006; La Rosa and Conner, 2017). These effects of floral display in male and female outcrossing are explained by pollinator behavior in this experiment. The proportion of visits increases with the increase in floral display, increasing the pollen export and thus male outcrossing, but this increase in visit is slower than the increase in floral display decreasing the probability for individual flowers to be visited, thus decreasing the female outcrossing. The increase in plant fidelity during bumblebee visits, favoring geitonogamy, with the increase in floral display could also explain this decrease in female outcrossing. These two patterns have also been observed in other experiment involving bumblebee pollination (Mitchell et al., 2004; Karron et al., 2004).

Regarding anthesis duration, higher anthesis duration only increases female outcrossing, more highly using the context-independent model. This result has many implications. First, it means that *Viola arvensis* can produce delayed outcrossing corresponding to a "wait-and-see" strategy (Ashman and Schoen, 1994), raising questions about the timing of selfing and the ability to fertilize all ovules through selfing. This strategy is not context-dependent, consistent with the higher effect found using context-independent model, and implies a visitation rate independent of the trait, consistent with the pollinator observations. Second, male outcrossing is, at least in observed ranges, independent from the flower longevity. This is consistent with the higher male daily fitness accrual rates observed in several species (Ashman and Schoen, 1994), allowing male outcrossing potential to be saturated earlier. This early saturation could be due to low pollen viability. Indeed Dajoz et al. (1993) found in another *Viola* species, *Viola diversifolia*, presenting 25% of 3- and 75% of 4-aperturate pollen grains, that just after dehiscence, 3-aperturate pollen grains are well representing 25% of the germinating pollen grains while they are representing approximately 50% after 48h. Therefore, considering that 3-aperturate pollen grains do not lost any germinating power within the 48h, it means that the total viable pollen population decreased by 50% by a decrease of 2/3 of the 4-aperturate population. This is an upper bound estimation given that it is likely that 3-aperturate pollen grains lost some viability too. Considering the majority of 5-aperturate pollen morph in this species, it is likely that pollen viability is of the order of 2 days or less which is the lower bound of the observed anthesis duration range.

Blind floral traits for pollinators still modulate outcrossing

Concerning traits apparently not mediating plant-pollinator interaction (ovule number, pollen:ovule ratio, mean number of apertures), no relation between them and pollinator attraction was indeed found. Ovule number and pollen:ovule ratio are affecting female outcrossing only in univariate analyses revealing correlations with other traits. A marginally significant effect of pollen:ovule ratio is nevertheless measured in multivariate analysis using context-independent model. The pollen:ovule ratio favors female outcrossing and more importantly using context-independent model. This is in contradiction with the mass action model (Holsinger, 1991), which is density- and frequency-dependent and predicting positive correlation within population between selfing rate and pollen:ovule ratio, only observed once to our knowledge (Damgaard and Abbott, 1995). This contradiction can be due to genetic correlation of pollen:ovule ratio to other unmeasured traits, like dichogamy or herkogamy (separation of sexes in time or space, respectively), modulating the selfing ability which is an intrinsic trait of the individual. The strong negative correlation between selfing rate and pollen:ovule ratio found at the population level under standard pollination environment reinforce this idea of pollen:ovule ratio as a good measure of context-independent selfing ability in *Viola arvensis*.

Mean number of apertures is the only trait showing strong antagonistic effects in male and female outcrossing. High number of apertures favors male outcrossing, while low number of apertures favors female outcrossing. This result is a demonstration of effective post-pollination gametophytic competition mediated by the number of apertures of pollen grains as suggested by Dajoz et al. (1993). Considering the relatively high activity of bumblebees in the experiment (personal observation), the disadvantage of having a high number of apertures is masked and only germination speed is the competitive factor. A pollen grain with more apertures germinate faster (Dajoz et al., 1993). Therefore, a plant producing more apertures in average has more competitive pollen grains, favoring male outcrossing when pollen

is deposited in foreign stigma, but disfavoring female outcrossing with foreign pollen grains having lower chance to gain competition compared to its own pollen grains on its own stigma. In contrast, a plant producing fewer apertures in average will be a bad competitor for male outcrossing in foreign stigma but will allow foreign pollen to gain the competition on its own stigma. The number of apertures is thus an important factor for outcrossing through both sexual functions.

Evolution pace and reversibility of selfing and selfing syndrome

The results have not only functional but also evolutionary consequences. In a context of selection of selfing, or outcrossing, traits affecting mating system will evolve toward values favoring selfing, respectively outcrossing. It seems straightforward that traits acting similarly through both sexual functions are those who will show the fastest evolution, while those affecting only one function will evolve slower (considering comparable effect sizes), and finally those acting antagonistically will show very slow evolution or stagnation. Such selection processes is consistent with measured evolution rates on the same populations of *Viola arvensis* which show similar evolutionary directions as those predicted in this study for all traits (Acoca-Pidolle et al., 2024; Acoca-Pidolle et al., submitted). Moreover, nectar guides is the floral traits showing the highest evolution rate in a context of increased selfing (Acoca-Pidolle et al., 2024), while pollen:ovule ratio exhibit no or a slower evolution and mean number of apertures exhibit no change at all (Acoca-Pidolle et al., submitted). These results need to be properly tested while investigating quantitative genetic parameters of the traits in these populations

In addition, traits favoring outcrossing antagonistically through both sexual functions could help to stabilize intermediate selfing rates, or at least slow down transition from outcrossing to selfing, and be another parameter for maintenance of mixed mating systems (Goodwillie et al., 2005; Igic and Kohn, 2006; Winn et al., 2011).

Traits with the highest effects on outcrossing are those modulating outcrossing through pollinator behavior, although pollinator blind floral traits, such as pollen:ovule ratio, still have effects. This questions the mechanisms underlying evolution toward selfing and its associated evolutionary dead-end, recurrently occurring in Angiosperms (Barrett, 2010; Goldberg et al., 2010). Is it due to fast evolution occurring after a decrease or loss in cross-pollination intensity due to a partial or complete loss of pollinators (e.g., pollinator declines, colonization of new areas), or to a slower evolution favored by intrinsic advantages of selfing, or to both and in this case in which proportion?

Finally, this study gives a simple method to test the context-dependency of the function of traits, which could have important implications in demography (Bell et al., 2021), but also on the evolutionary reversibility. For example, if traits mediating plant-pollinator interactions favor outcrossing more through their absolute values, which is partly the case in this study, we can hypothesis that during evolution of a selfing syndrome (e.g., in case of pollinator declines), the trait value can easily pass below a threshold under which plant-pollinator interactions are definitively lost impeding any backward evolution towards outcrossing. Oppositely, such a threshold does not exist if traits are mediating plant-pollinator interactions through relative values because pollinators will select traits regarding the position of the values in the distribution regardless to their absolute values. This is essential to understand if the current evolution toward selfing syndrome, likely promoted by global pollinator declines, is always reversible or if there is a point of no-return, which may have been reached.

Acknowledgments

The authors thank David Delguerde for construction and installation of insect-proof cages, Perrine Gauthier, Antoine Deverge Merdrignac, Louis Devresse, Virginie Pons, Sandrine Maurice-Oms, and Marine Fauché for help during data collection, Marie-Pierre Dubois and François Gatchitch for help during genotyping, Pauline Durbin, Fabien Lopez, and Thierry Mathieu for help in taking care of the plants during the experiment, the Conservatoire Botanique National de Bailleul and the Conservatoire Botanique National du Bassin Parisien for the supply of seeds and information on sampling locations. Genotyping data were obtained using technical facilities of GenSeq of the "Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier" with the support of LabEx CeMEB an ANR "Investissements d'avenir" program (ANR-10-LABX-04-01).

Competing interests

Authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

S.A.-P.: Conceptualisation, investigation, data collection, formal analysis, visualisation, writing. P.-O.C.: Conceptualisation, writing, supervision.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study will be openly available in data.InDoRES as soon as this study is published.

References

- S. Acoca-Pidolle, P. Gauthier, L. Devresse, A. Deverge Merdrignac, V. Pons et P.-O. Cheptou (2024). Ongoing convergent evolution of a selfing syndrome threatens plant-pollinator interactions. *New Phytologist*, 242(2):717–726. doi: 10.1111/nph.19422.
- T.-L. Ashman et C. Diefenderfer (2001). Sex ratio represents a unique context for selection on attractive traits: consequences for the evolution of sexual dimorphism. *The American Naturalist*, 157(3):334–347. doi: 10.1086/319192.
- T.-L. Ashman et M. T. Morgan (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(1539):553–559. doi: 10.1098/rspb.2003.2642.
- T.-L. Ashman et D. J. Schoen (1994). How long should flowers live? *Nature*, 371(6500):788–791. doi: 10.1038/371788a0.
- S. C. H. Barrett (2010). Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1537):99–109. doi: 10.1098/rstb.2009.0199.
- D. Bates, M. Mächler, B. Bolker et S. Walker (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1):1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01.

- D. A. Bell, R. P. Kovach, Z. L. Robinson, A. R. Whiteley et T. E. Reed (2021). The ecological causes and consequences of hard and soft selection. *Ecology Letters*, 24(7):1505–1521. doi: 10.1111/ele.13754.
- G. Bell (1985). On the function of flowers. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 224(1235):223–265. doi: 10.1098/rspb.1985.0031.
- S. Benitez-Vieyra, A. M. Medina, E. Glinos et A. A. Cocucci (2006). Pollinator-mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated orchid. *Functional Ecology*, 20(6):948–957. doi: 10.1111/j.1365-2435.2006.01179.x.
- S. A. Bodbyl Roels et J. K. Kelly (2011). Rapid evolution caused by pollinator loss in *Mimulus guttatus*. *Evolution*, 65(9):2541–2552. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01326.x.
- R. Brys et H. Jacquemyn (2012). Effects of human-mediated pollinator impoverishment on floral traits and mating patterns in a short-lived herb: an experimental approach. *Functional Ecology*, 26(1):189–197. doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01923.x.
- M. Burd et H. S. Callahan (2000). What does the male function hypothesis claim? *Journal of Evolutionary Biology*, 13(5):735–742. doi: 10.1046/j.1420-9101.2000.00220.x.
- D. R. Campbell (1989). Measurements of selection in a hermaphroditic plant: Variation in male and female pollination success. *Evolution*, 43(2):318–334. doi: 10.1111/j.1558-5646.1989.tb04230.x.
- D. R. Campbell, N. M. Waser, M. V. Price, E. A. Lynch et R. J. Mitchell (1991). Components of phenotypic selection: pollen export and flower corolla width in *Ipomopsis aggregata*. *Evolution*, 45(6):1458–1467. doi: 10.1111/j.1558-5646.1991.tb02648.x.
- P.-O. Cheptou, E. Imbert et M. Thomann (2022). Rapid evolution of selfing syndrome traits in *Viola arvensis* revealed by resurrection ecology. *American Journal of Botany*, 109(11):1838–1846. doi: 10.1002/ajb2.16028.
- R. W. Cruden (1977). Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31(1):32. doi: 10.2307/2407542.
- I. Dajoz, I. Till-Bottraud et P.-H. Gouyon (1993). Pollen aperture polymorphism and gametophyte performance in *Viola diversifolia*. *Evolution*, 47(4):1080–1093. doi: 10.1111/j.1558-5646.1993.tb02137.x.
- C. Damgaard et R. J. Abbott (1995). Positive correlations between selfing rate and pollen-ovule ratio within plant populations. *Evolution*, 49(1):214–217. doi: 10.1111/j.1558-5646.1995.tb05973.x.
- L. F. Delph et T.-L. Ashman (2006). Trait selection in flowering plants: how does sexual selection contribute? *Integrative and Comparative Biology*, 46(4):465–472. doi: 10.1093/icb/icj038.
- J. P. Foxe, T. Slotte, E. A. Stahl, B. Neuffer, H. Hurka et S. I. Wright (2009). Recent speciation associated with the evolution of selfing in *Capsella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13): 5241–5245. doi: 10.1073/pnas.0807679106.
- C. Galen (1989). Measuring pollinator-mediated selection on morphometric floral traits: bumblebees and the alpine sky plot *Polemonium viscosum*. *Evolution*, 43(4):882–890. doi: 10.1111/j.1558-5646.1989.tb05185.x.
- E. E. Goldberg, J. R. Kohn, R. Lande, K. A. Robertson, S. A. Smith et B. Igic (2010). Species selection maintains self-incompatibility. *Science*, 330(6003):493–495. doi: 10.1126/science.1194513.
- C. Goodwillie, S. Kalisz et C. G. Eckert (2005). The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36(1):47–79. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.36.091704.175539.

- C. Goodwillie, R. D. Sargent, C. G. Eckert, E. Elle, M. A. Geber, M. O. Johnston, S. Kalisz, D. A. Moeller, R. H. Ree, M. Vallejo-Marin et A. A. Winn (2010). Correlated evolution of mating system and floral display traits in flowering plants and its implications for the distribution of mating system variation. *New Phytologist*, 185(1):311–321. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03043.x.
- L. D. Harder et S. D. Johnson (2023). Beyond pollen:ovule ratios: Evolutionary consequences of pollinator dependence and pollination efficiency for pollen and ovule production in angiosperms. *American Journal of Botany*, 110(6):e16177. doi: 10.1002/ajb2.16177.
- K. E. Holsinger (1991). Mass-action models of plant mating systems: the evolutionary stability of mixed mating systems. *The American Naturalist*, 138(3):606–622. doi: 10.1086/285237.
- B. Iqic et J. R. Kohn (2006). The distribution of plant mating systems: study bias against obligately outcrossing species. *Evolution*, 60(5):1098–1103. doi: 10.1111/j.0014-3820.2006.tb01186.x.
- S. T. Kalinowski, M. L. Taper et T. C. Marshall (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5): 1099–1106. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x.
- J. D. Karron, R. J. Mitchell, K. G. Holmquist, J. M. Bell et B. Funk (2004). The influence of floral display size on selfing rates in *Mimulus ringens*. *Heredity*, 92(3):242–248. doi: 10.1038/sj.hdy.6800402.
- J. K. Kelly (2024). Rapid adaptation of *Viola arvensis* to pollinator declines. *New Phytologist*, 242(2): 331–332. doi: 10.1111/nph.19547.
- R. J. La Rosa et J. K. Conner (2017). Floral function: effects of traits on pollinators, male and female pollination success, and female fitness across three species of milkweeds (*Asclepias*). *American Journal of Botany*, 104(1):150–160. doi: 10.3732/ajb.1600328.
- M. Latron, J.-F. Arnaud, H. Ferla, C. Godé et A. Duputié (2018). Polymorphic nuclear markers for coastal plant species with dynamic geographic distributions, the rock samphire (*Crithmum maritimum*) and the vulnerable dune pansy (*Viola tricolor subsp. curtisii*). *Molecular Biology Reports*, 45(3):203–209. doi: 10.1007/s11033-018-4153-4.
- D. G. Lloyd (1992). Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, 153(3):370–380.
- D. G. Lloyd et D. J. Schoen (1992). Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences*, 153(3):358–369. doi: 10.1086/297040.
- R. Mitchell, J. Karron, K. Holmquist et J. M. Bell (2004). The influence of *Mimulus ringens* floral display size on pollinator visitation patterns. *Functional Ecology*, 18(1):116–124. doi: 10.1111/j.1365-2435.2004.00812.x.
- M. T. Morgan et D. J. Schoen (1997). Selection on reproductive characters: floral morphology in *Asclepias syriaca*. *Heredity*, 79(4):433–441. doi: 10.1038/hdy.1997.178.
- R. Ornduff (1969). Reproductive biology in relation to systematics. *TAXON*, 18(2):121–133. doi: 10.2307/1218671.
- S. G. Potts, J. C. Biesmeijer, C. Kremen, P. Neumann, O. Schweiger et W. E. Kunin (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6):345–353. doi: 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- K. Ritland (2002). Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity*, 88(4):221–228. doi: 10.1038/sj.hdy.6800029.

- K. Ritland (2021). mltr - Program for estimating multilocus outcrossing rate (t) and correlated matings (r). doi: 10.13140/RG.2.2.14456.57608.
- A. Scoppola et E. Lattanzi (2012). *Viola* section *Melanium* (Violaceae) in Italy. New data on morphology of *Viola tricolor*-Group. *Webbia*, 67(1):47–64. doi: 10.1080/00837792.2012.10670908.
- A. Scoppola et S. Magrini (2019). Comparative palynology and seed morphology in annual pansies (*Viola* sect. *Melanium*, Violaceae): implications for species delimitation. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153(6):883–899. doi: 10.1080/11263504.2019.1610113.
- D. V. Shaw, A. L. Kahler et R. W. Allard (1981). A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(2):1298–1302. doi: 10.1073/pnas.78.2.1298.
- A. Sicard et M. Lenhard (2011). The selfing syndrome: a model for studying the genetic and evolutionary basis of morphological adaptation in plants. *Annals of Botany*, 107(9):1433–1443. doi: 10.1093/aob/mcr023.
- A. Sicard, N. Stacey, K. Hermann, J. Dessoly, B. Neuffer, I. Bäurle et M. Lenhard (2011). Genetics, evolution, and adaptive significance of the selfing syndrome in the genus *Capsella*. *The Plant Cell*, 23(9):3156–3171. doi: 10.1105/tpc.111.088237.
- R. E. Stephens, R. V. Gallagher, L. Dun, W. Cornwell et H. Sauquet (2023). Insect pollination for most of angiosperm evolutionary history. *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.18993.
- M. Thomann, E. Imbert, C. Devaux et P.-O. Cheptou (2013). Flowering plants under global pollinator decline. *Trends in Plant Science*, 18(7):353–359. doi: 10.1016/j.tplants.2013.04.002.
- I. Till-Bottraud, A. Mignot, R. De Paepe et I. Dajoz (1995). Pollen heteromorphism in *Nicotiana tabacum* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 82(8):1040–1048. doi: 10.1002/j.1537-2197.1995.tb11569.x.
- T. van der Niet et S. D. Johnson (2012). Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(6):353–361. doi: 10.1016/j.tree.2012.02.002.
- B. Wallace (1975). Hard and soft selection revisited. *Evolution*, 29(3):465. doi: 10.2307/2407259.
- P. Wilson, J. D. Thomson, M. L. Stanton et L. P. Rigney (1994). Beyond floral batemania: gender biases in selection for pollination success. *The American Naturalist*, 143(2):283–296. doi: 10.1086/285604.
- A. A. Winn, E. Elle, S. Kalisz, P.-O. Cheptou, C. G. Eckert, C. Goodwillie, M. O. Johnston, D. A. Moeller, R. H. Ree, R. D. Sargent et M. Vallejo-Marín (2011). Analysis of inbreeding depression in mixed-mating plants provides evidence for selective interference and stable mixed mating. *Evolution*, 65(12):3339–3359. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01462.x.

SCÉNARIOS POUR L'ÉVOLUTION RAPIDE DE L'AUTOFÉCONDATION
ET DU SYNDROME ASSOCIÉ



MANUSCRIT **IV**

CARACTÉRISATION DE L'ÉVOLUTION RAPIDE DU SYNDROME D'AUTOFÉCONDATION :
DÉPRESSION DE CONSANGUINITÉ, HÉRITABILITÉ ET INTENSITÉ DE SÉLECTION



Cet article est une ébauche montrant des pistes de réflexion et demande encore du travail.



Characterizing rapid evolution of a selfing syndrome: inbreeding depression, heritability and intensity of selection

SAMSON ACOCA-PIDOLLE* AND PIERRE-OLIVIER CHEPTOU

CEFE, Univ. Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

*Corresponding author, email address: samson.acoca-pidolle@cefe.cnrs.fr

Abstract

- Selfing is associated to a set of traits called selfing syndrome. Rapid increase of selfing rates has been reported in *Viola arvensis*. This increase is associated to a rapid change in floral traits related to pollinator attraction, such as decrease in petal size or nectar production, but not in others unrelated, such as sepal length. Pollen and ovule traits, related to selfing but not to pollinator attraction, show mitigated changes. Increased selfing, while increasing inbreeding depression, could be responsible of observed changes and low heritabilities could explain the absence or low changes of traits unrelated to pollinators.
- Using the resurrection ecology methodology, we grown four pairs of ancestral and descendant populations over two generations, parental and offspring, of *Viola arvensis*. Offspring generation is family designed. All the individual in the two generations are fully genotyped and phenotyped. We measured inbreeding depression comparing inbred and outbred individuals of the offspring generation and heritability using siblings comparisons.
- Inbreeding depression is low for all traits for ancestral and descendant populations and only significant for integrative traits such as biomass and floral display, rising to 13% and 15% of depression respectively. Heritability is higher than 0.4 for all the floral traits, even sepal length, but estimations are not fully concordant and need further work.
- These results ruled out the hypothesis of a change mainly due to inbreeding depression. The relatively high heritability of traits experiencing no change support the idea that they experienced different selective pressures than traits related to pollinators.

Key words: Rapid evolution, inbreeding depression, heritability, selection intensity, mating system, selfing syndrome, *Viola arvensis*

Introduction

Evolution from outcrossing to selfing is one of the most common evolutionary transition in flowering plants (Stebbins, 1957; Barrett, 2002). The evolution of selfing is favored by the reproductive assurance, in case of pollen limitation, and automatic advantage associated to selfing (Lloyd, 1992). The automatic advantage of selfing is due to the transmission of genes through ovules, pollen exported, as outcrossing individuals, and pollen self-fertilizing in addition. Selfing, by increasing homozygosity, can produce inbreeding depression, a major force acting against selection of selfing (Darwin, 1862; Lande and Schemske, 1985; Charlesworth and Charlesworth, 1987; Lloyd, 1992; Porcher and Lande, 2005). Theoretical models predict a purging of deleterious alleles causing inbreeding depression with increasing selfing by exposing them to selection, inducing an evolutionary runaway of selfing (Lande and Schemske, 1985; Charlesworth and Charlesworth, 1987; Porcher and Lande, 2005). However, evidence of purging has revealed mixed conclusions (Winn et al., 2011). Pollen discounting, which is the loss of pollen used for selfing to siring seeds in other plants, is also reducing the automatic advantage of selfing (Lloyd, 1992; Porcher and Lande, 2005).

Selfing species are characterized by a set of traits, called selfing syndrome (Ornduff, 1969; Sicard and Lenhard, 2011). Selfing taxa evolve smaller, less conspicuous and odorous flowers with lower pollen:ovule ratios, dichogamy and herkogamy than outcrossing animal-pollinated relatives (Bodbyl Roels and Kelly, 2011; Sicard et al., 2011; Brys and Jacquemyn, 2012). However, the evolutionary pace of each trait associated with the selfing increase is not clear (Sicard and Lenhard, 2011; Bodbyl Roels and Kelly, 2011).

Aside Bodbyl Roels and Kelly (2011), no experimental evolution experiment studied development of the selfing syndrome. The current pollinator declines reported all around the world can impact plant demography but also plant mating system (Lloyd, 1992; Biesmeijer et al., 2006; Potts et al., 2010). Indeed, pollinators are important selective agent for animal-pollinated flowers and pollinator declines represent novel and potentially strong selective pressures (Mitchell and Ashman, 2008; Thomann et al., 2013; Van der Niet et al., 2014). Few studies have explored this evolution, likely due to the lack of baseline and long-term survey of floral traits. Resurrection ecology methods, using conservation of dormant individual, allow to grow together individuals from ancestral and descendant populations and have been used to alleviate this gap. It is an interesting methodology to test the evolution of floral traits under pollinator declines (Thomann et al., 2015; Franks et al., 2018; Weider et al., 2018). Using this methodology, it has been shown that the field Pansy (*Viola arvensis*, Murray, 1770) experienced an increase in selfing rates and rapid changes of floral traits constituting a selfing syndrome, more mitigated for pollen:ovule ratio (Acoca-Pidolle et al., 2024; Acoca-Pidolle et al., submitted).

These ongoing changes, likely during a pollinator declines (Biesmeijer et al., 2006; Potts et al., 2010), tells us that within 20-30 years, floral area can be diminished by 10% and nectar production by 20% (Acoca-Pidolle et al., 2024). These differences were measured in common garden, erasing differences due to environmental variations, and therefore are due to genotypic variations. These changes can be due explain by two hypotheses. First, increased selfing can be the responsible of this decrease through inbreeding depression on traits, which implies no evolution of the traits and a possibility to easily restore ancestral states through increasing outcrossing. Second, it is due to evolution rather than inbreeding depression, calculating heritability and genetic correlation of traits would allow to estimate

intensity of selection imposed on each trait using breeder's equation to better understand selective pressures at work. Heritability estimation requires estimation of additive genetic variance, which can be measured from the resemblance of relatives. However, measuring additive genetic variance in inbred population is a challenging task because of inbreeding effects disabling the purely additive model and needs family structure measures with different degree of kinship (Cockerham and Weir, 1984; Kelly, 1999; Kelly and Arathi, 2003).

Using the unique material of four pairs of ancestral and descendant populations of *Viola arvensis* phenotyped and genotyped through two generations, the second organized in a family design, experiencing increase of selfing and change of traits associated to selfing syndrome, the general purpose of this study is to propose a scenario for evolution occurred during the last decades in these populations. The first aim is to understand if trait changes can solely be attributed to inbreeding depression or implies evolution of traits. Estimating heritability and genetic covariance of traits, the second aim is to measure the selection intensity imposed on each trait to understand selective forces acting. If evolution of selfing syndrome is due to pollinator declines, we expect to find higher selective pressure on traits mediating interaction with pollinators than others implied in increased selfing.

Followings are only preliminary results concerning pollen discounting, inbreeding depression and imprecise estimate of heritability. Further work is needed.

Material and methods

Study system, sampling, design and data acquisition methods are also presented in Acoca-Pidolle et al. (2024), Acoca-Pidolle et al. (submitted) and Acoca-Pidolle & Cheptou (unpublished).

Study system and sampling

Viola arvensis Murray (2n = 34) is an annual species of wild pansy (Violaceae). It is commonly found in fields as a weed or in meadows. This species is self-compatible with a mixed mating system (Scoppola and Lattanzi, 2012; Cheptou et al., 2022; Acoca-Pidolle et al., 2024). This species possesses tricarpellary syncarpous ovary, each carpel containing several ovules and presents a pollen heteromorphism, thus produces different pollen morphs with different numbers of apertures within individual, within anther (Till-Bottraud et al., 1995; Scoppola and Magrini, 2019). *Viola arvensis* produces a majority of 5-aperturate pollen grains but can also produce 4- and 6-aperturate morphs (Scoppola and Magrini, 2019; Acoca-Pidolle et al., submitted).

Following a resurrection ecology protocol, plants were sampled twice in agricultural fields in four locations of the Parisian Basin. The first sampling was done by the Conservatoire Botanique National de Bailleul for Crouy (Cr; 49°24'24.31"N, 3°22'20.73"E) and Lhuys (Lh; 49°16'35.40"N, 3°32'58.52"E) in the 1990s and by the Conservatoire Botanique National du Bassin Parisien for Commeny (Co; 49°7'37.11"N, 1°53'46.30"E) and Guernes (Gu; 49° 1'10.75"N, 1°38'46.82"E) in the 2000s. Seeds were collected by sampling fruits on a minimum of 100 mothers picked randomly in each population. The second sampling was performed in exactly the same locations, in an area that overlapped the ancestral sampling area as much as possible, in February 2021 by randomly sampling 40 or more seedlings. The minimal sampling areas was of 2,000 m² and correspond to cases where all the population is

circumscribed on this area. This sampling scheme produced four pairs, one for each location, of ancestral (A) and descendant (D) populations, thus eight populations in total.

Experimental design

The parental generation was grown in common garden with plants (ancestral and descendant) originated from the field. As ancestral populations were stored seeds and descendant ones were collected at seedling stage in the field, common conditions started at seedling stage. For ancestral populations, in mid-November 2020, seed lots were placed in germination chambers in Petri dishes with vermiculite under light at 15°C for 12h and in the dark at 6°C for 12h. Germination rates were of 50% to 65%. 32 seedlings of ancestral and descendant populations were transplanted in late February 2021 in the field of the Baillarguet site of the experimental platform "Terrains d'Expériences" of the Labex Cemeb, 10 km north of Montpellier, France (43°40'53.92"N, 3°52'28.74"E). Populations were separated in insect-proof mesh cages of 290×180 cm². During full blooming, in mid-April, we introduced commercial bumblebee hives, Natupol from Koppert France® (Cavaillon, France), into the cages to produce open-pollinated fruits. Thus, each cage had the same insect pollination environment. We collected from one to three fruits per individual produced in this pollination context and mixed them into a single batch of seeds. Three events of mortality were observed before exposition to pollinators two in CrD and one in LhD populations.

The collected seeds produced by the parental generation were used to grow the offspring generation. We randomly selected 20 mother plants per population in the parental generation to construct 20 families. In December 2021, 30 seeds per family were placed in germination chambers in Petri dishes with vermiculite under light at 15°C for 12h and in the dark at 6°C for 12h. Germination rates per population range between 75% and 90%. In each family we selected five seedlings to establish families composed of five siblings (Fig. S1). Three families did not germinate enough to obtain five plants and thus were composed of one, two and four siblings. Therefore, we grow 793 progenies from 160 mothers and 252 fathers. Plants were placed in individual pots (11×11×11 cm³) filled with standardized soil in late February 2022 and randomized in a greenhouse of the experimental platform "Terrains d'Expériences" of the Labex Cemeb, Montpellier, France. Watering was manual and done when needed. In total, 792 plants were followed during this experiment and no early mortality was observed. When all the morphological measurements were performed, plants were moved outside to complete their life cycle.

Individuals used in this study are the same as those used in the previous study of *Acoca-Pidolle et al. (2024)* with the parental population corresponding to the F0 generation and the progenies being the F1 generation.

Genotyping, inbreeding status and paternity

A fresh leaf was collected in all the plants in parental and offspring generations for genotyping. DNA was extracted using Dneasy Plant Mini Kit from QIAGEN® directly from fresh leaves for parental generation and from leaves conserved in coffee filters with silica gel for progenies. The 252 parental plants and 784 of the 793 progenies were genotyped after double-reading of eleven microsatellite

markers, 6 designed for *Viola arvensis* (Cheptou et al., 2022) and 5 designed on *Viola tricolor* (Latron et al., 2018), a closely related species (Scoppola and Lattanzi, 2012).

Given low allelic diversity of loci within parental populations (2.7 alleles per loci per population in average, with some monomorphic loci), paternity assignment was challenging, and we chose to assume that mistyping (including misreading, mistyping, or mutation) was unlikely. We firstly manually checked our 784 progenies and assigned them as resulting of a selfing event if their genotype can be obtained pairing two maternal haplotype. By this way, we obtained population selfing rates very close to those estimated using MLTR program, which indicate that our selfing assignment was correct (Acoca-Pidolle & Cheptou, unpublished). Second, manual assignment of putative fathers for the 95 progenies produced by outcrossing, considering no mistyping, was performed. 39 progenies for which a single putative father was found have been directly assigned to this father. Third, remaining progenies were assigned using CERVUS software (Kalinowski et al., 2007). Populations were analyzed one by one. Allelic frequencies were calculated using parental genotypes, then paternity assignation simulations were performed on 10 000 offspring given 32 candidate fathers representing 100% of candidate fathers, 95% of loci typed, 0.5% mistyping error, and a minimum of 7 loci typed. When the most likely father was unambiguous, this father was assigned, which was the case for 28 progenies. For three progenies, with two most likely fathers, one implies mistyping, in these three cases the father implying no mistyping was assigned. At the end, 70 paternities among the 95 outcrossing progenies were assigned following this procedure, so 25 remained unassigned. The 70 paternities were distributed among 43 fathers. Among the 43 fathers contributing to outcrossing, only 33, responsible of 57 outcrossing, correspond to mothers chosen to establish families, thus have their selfing rates being estimated.

Measurements of plant traits

All the monitoring and measurements of parental and offspring generations were performed by a single experimenter using a digital caliper to the nearest 0.01 mm, avoiding any experimenter effect.

In the parental generation, a maximum of three flowers per plant were simultaneously monitored by labelling flowers with a color mark on the pedicel and checking them on Mondays, Wednesdays, and Fridays from the beginning of the blooming 1 March to 19 May 2021. At the first anthesis of the individual, flowering date was recorded, and rosette diameter was measured. On an average of 14.5 flowers per plant (SD = 7.9), anthesis duration was recorded and minimum three days after anthesis, labellum width, corolla length, sepal length and number of floral guides were measured. Labellum width and corolla length measured were highly correlated ($r = 0.78$, $P < 0.001$), and thus summarized by multiplying them to obtain a floral area approximation (correlated to more than 0.93 with the two original traits) used in the following analyses. During each survey, the number of opened flowers per plant was counted. These measurement sequences were integrated using trapezoidal rule between the flowering date of the plant and the last day of measurement, giving the average floral display. Nectar volume was collected and cumulated from three flowers per plant using 0.5 μ L microcapillaries in all the individuals of CoA and CoD populations, within 2 hours a morning of late May.

In the offspring generation, the first anthesis was recorded as flowering date, and corolla length, labellum width, sepal length, number of guides and anthesis duration were measured on the five first opened flowers of the main stem of each plant. Measurements were made day+2 after anthesis, or day+3 when falling on weekends. The opening of flowers was followed every working day to assess the

anthesis duration. As in the parental generation, labellum width and corolla length were summarized by multiplying them to obtain a floral area approximation. The number of flowers opened per plant was counted each working day, from the opening of the first flower, for one month and half, and two more times with one week and then two weeks delay between counts. These measurement sequences were also integrated using trapezoidal rule between the flowering date of the plant and the last day of measurement, giving the average floral display. Nectar volume was collected and cumulated from three flowers per plant using 0.5 μ L microcapillaries. It was measured randomly on half of the individuals of a pair of ancestral and descendant populations simultaneously, representing all the families, thus 400 plants were sampled. For the two generations, biomass was measured to the nearest 0.01 g on dried plants after the end of their life cycle.

In order to measure pollen and ovules traits, one bud close to anthesis per plant was collected and frozen at -20 °C in a labelled tube within 2 days in May 2021, randomly in the plant, for parental generation and between 26 April and 12 May 2022, only in the main stem, for offspring generation. We defrosted and dissected them between July and October 2023. Under binocular magnifier, one of the five anthers was dilacerated in a drop of lactic acid on a microscope slide and then under microscope the three morphs of pollen grains (4-, 5-, or 6-aperturate) were counted using a mounted bank of three counters. The ovary was isolated, incised under binocular magnifier and ovules were manually counted. The pollen:ovule ratio was calculated by multiplying the number of pollen grains contained in one anther by five to obtain a flower-wide estimate, divided by the number of ovules. The mean number of apertures was calculated multiplying frequencies of morphs by the number of apertures they exhibit. For parental generation, a single experimenter, dissected buds, and counted ovules and pollen grains, while all dissections and ovule counts were performed by a second experimenter for the offspring generation.

Statistical analyses

First of all, repeated floral measures were averaged to obtain a unique measure at the individual scale. Due to the low number of outcrossed offspring analyses by population was not possible, despite its relevance in quantitative genetics.

Pollen discounting can be estimated looking at the number of outcrossed offspring sired by a plant in function of the proportion of selfed offspring it produced. It was estimated in the parental generation using a generalized linear mixed model (GLMM) with the number of outcrossed offspring sired as response variable (following a Poisson law), the proportion of selfed offspring as fixed effect and the population as random effect.

To test effects of inbreeding depression in traits, a linear mixed model (LMM) was fitted on each offspring traits with inbred status (selfed or outcrossed), age (ancestral or descendant) and interaction between the two as fixed effects, and locality and family nested within locality as random effects. Interaction aims to test a change in inbreeding depression between ancestral and descendant population due purge or accumulation of a genetic load. Because interaction showed little effects non-significant to the 95% confidence threshold for all traits, the inbreeding depression was calculated for the trait, without considering ancestral or descendant state, using model estimates as follow: $\delta = 1 - \frac{\text{selfed estimate}}{\text{outcrossed estimate}}$.

For simplicity, we assume strictly additive inheritance and estimate the additive variance v_a , equal to heritability h^* using the parent-offspring regressions and the family design. Additive variance v_a

is equal to regression of offspring phenotypes into maternal one for selfed offspring r_{selfed} and to two times the regression for outcrossed offspring $r_{outcrossed}$. To obtain the more accurate estimation of heritability h^* , we used both regressions as follow: $h^* = f_{selfed} \times r_{selfed} + f_{outcrossed} \times 2 r_{outcrossed}$, where f_{selfed} and $f_{outcrossed}$ represent the fractions of selfed and outcrossed offspring respectively. Using the family design, proportion of variance between siblings compared to total variance is equal to additive variance for full-sibs and half of additive variance for half-sibs. Given the low number of half-sibs in our dataset, we only estimate additive variance using full-sibs, decomposing variance of the trait using a LMM with the family effect as random effect. Full-sibs in our case are inbred sibs which could introduce several bias in case of non-strictly additive inheritance (Kelly and Arathi, 2003). 95% confidence intervals are calculated from distribution of h^* estimated during 2000 bootstraps where 80% of the families were randomly sampled. If intervals comprise negative values or values superior to 1, it was manually attributed to 0 or 1 respectively.

All our statistical analyses were performed using the R software (R Core Team, Version 4.2.1). LMMs and GLMM were performed using the "lmer" and "glmer" functions implemented in the package LME4 (Bates et al., 2015).

Results

The number of outcrossed offspring sired exhibits no relation with the proportion of selfed offspring (Figure 1, estimate = 0.7, $P = 0.3$). Therefore, we detect no pollen discounting using this measure.

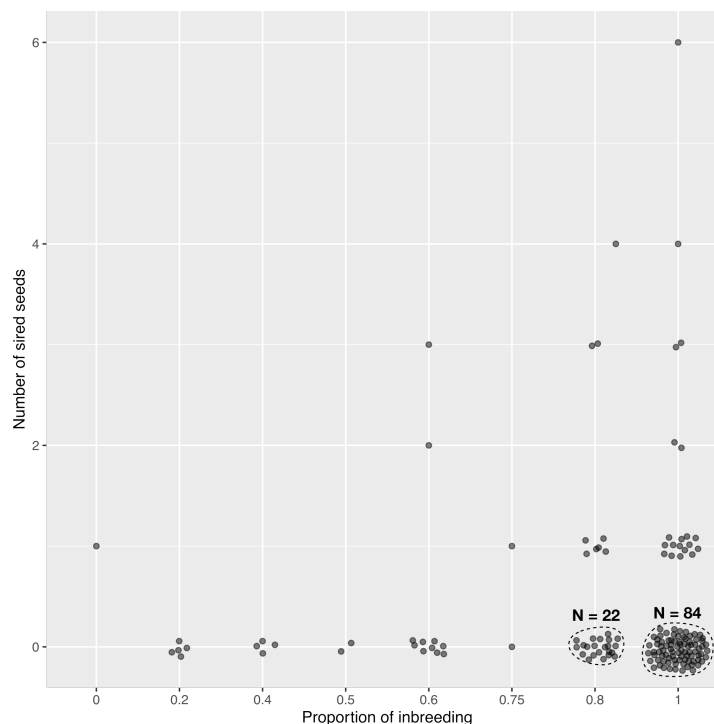


Figure 1: Measure of pollen discounting

Number of seeds sired through outcrossing for 160 plants with known proportion of selfed offspring. A total of 57 outcrossing is reported and distributed between 33 plants.

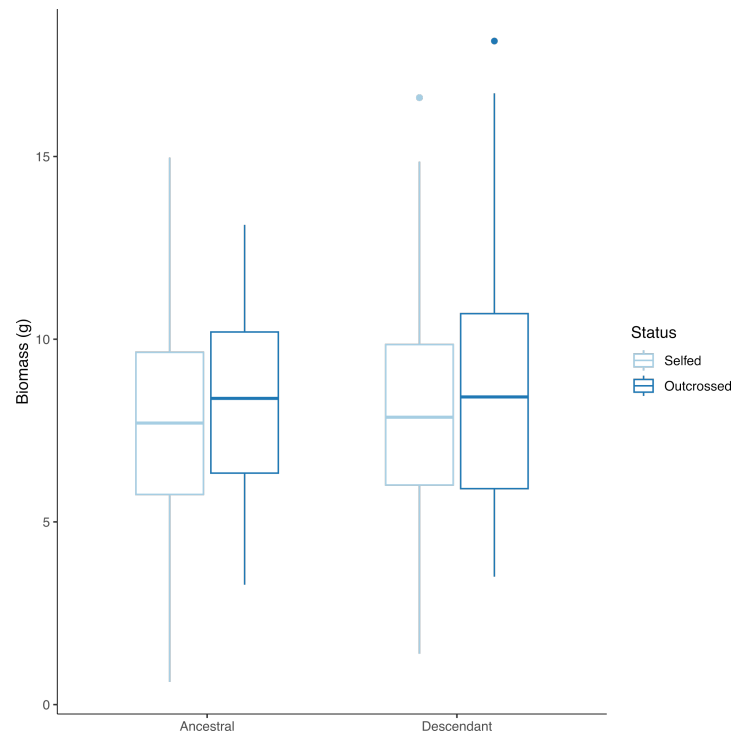


Figure 2: Inbreeding depression in ancestral and descendant populations
 Biomass is used as a proxy of fitness. Because of the low number of outcrossed offspring ($N = 95$), the 4 ancestral populations are pooled together, as the 4 descendant populations.

Only biomass and average floral display present significant inbreeding effects with an inbreeding depression of 13% and 15% respectively (**Figure 2, Table 1**). Floral area, sepal length and number of ovules have near significant inbreeding effects with inbreeding depressions comprised between 3% and 6%. No trait presents a significant interaction between the inbreeding effects and population age (**Figure 2, Table 1**).

Heritability estimations differ greatly using parent-offspring regression or family design (Table 2). Heritability of flowering date, rosette diameter and biomass present low or null heritability using the offspring-parent regression, while they are low but non-null using the family design (**Table 2**). Floral area, number of nectar guides and anthesis duration present the highest heritability, while nectar volume and floral display present low heritability (**Table 2**). Sepal length, number of ovule and mean number of aperture present moderate heritability while pollen:ovule ratio possess low heritability (**Table 2**).

Discussion

The purpose of this study was to suggest a scenario explaining evolution of selfing and selfing syndrome in four populations of *Viola arvensis*. We found no pollen discounting and a moderate inbreeding depression. Concerning traits, we found almost no inbreeding depression and relatively high heritability for all floral and reproductive traits.

Table 1: Estimations of inbreeding depression of traits

Effect of inbred status, age status of the population and interaction between the two using a linear mixed model. Inbreeding depression was computed from estimates of the model. Inbreeding depressions significantly not equal to zero at the 95% threshold are presented in bold. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Trait	N	Inbred status	Age	Inbred status x Age	Inbreeding depression
Flowering date	784	n.s.	n.s.	n.s.	0 %
Floral area approximation	784	• ($P = 0.059$)	***	n.s.	6 %
Number of nectar guides	784	n.s.	***	n.s.	0 %
Sepal length	784	• ($P = 0.064$)	n.s.	n.s.	3 %
Anthesis duration	784	n.s.	**	n.s.	0 %
Average floral display	781	**	*	n.s.	15 %
Nectar volume (log)	395	n.s.	***	n.s.	16 %
Quantity of pollen	395	n.s.	n.s.	n.s.	3 %
Number of ovules	395	• ($P = 0.088$)	n.s.	n.s.	3 %
Pollen:ovule ratio	395	n.s.	n.s.	n.s.	1 %
Mean number of apertures	395	n.s.	n.s.	n.s.	1 %
Rosette diameter	784	n.s.	n.s.	n.s.	2 %
Biomass	769	*	n.s.	n.s.	13 %

Table 2: Estimations of heritability of traits

Heritability is given calculated through two methods, parent-offspring regression and full-sib family. The 95% confidence intervals are computed bootstrapping 80% of families 2000 times.

Trait	N	Heritability (parent-offspring)	Heritability (full-sib family)
Flowering date	784	0.00 [0-0.05]	0.37 [0.31-0.42]
Floral area approximation	784	0.81 [0.72-0.88]	0.62 [0.58-0.66]
Number of nectar guides	784	0.55 [0.53-0.58]	0.71 [0.68-0.74]
Sepal length	784	0.44 [0.34-0.53]	0.41 [0.35-0.46]
Anthesis duration	784	0.97 [0.87-1]	0.69 [0.65-0.72]
Average floral display	781	0.17 [0.13-0.22]	0.25 [0.20-0.28]
Nectar volume	395	0.26 [0.13-0.42]	0.18 [0.10-0.24]
Quantity of pollen	395	0.50 [0.44-0.57]	0.29 [0.20-0.37]
Number of ovules	395	0.48 [0.43-0.55]	0.57 [0.51-0.61]
Pollen:ovule ratio	395	0.37 [0.31-0.43]	0.19 [0.11-0.28]
Mean number of apertures	395	0.39 [0.31-0.47]	0.45 [0.34-0.54]
Rosette diameter	784	0.07 [0-0.19]	0.18 [0.13-0.23]
Biomass	769	0.00 [0-0.01]	0.12 [0.08-0.16]

No constraint to selfing evolution

Biomass can be used as a proxy of fitness. Inbreeding depression for biomass is higher than zero but lower than the 50% threshold invoked to act against the automatic advantage of selfing (Lloyd, 1992). It can sign that selfing rates in ancestral populations of *Viola arvensis* was sufficient to reduce inbreeding depression allowing increased selfing (Charlesworth and Charlesworth, 1987). In addition, no pollen discounting is observed, thus increase in selfing should be favored, at least theoretically (Lloyd, 1992; Porcher and Lande, 2005).

Contrary to expectations, no change in inbreeding depression is observed with the increase in selfing. This could be due to the already low inbreeding depression inducing low additional purging with the increase in selfing, or to the fact that selfing and inbreeding depression are not at equilibrium, the purge presenting a lag compared to rapid increase in selfing in our case (Winn et al., 2011).

These results suggest that selfing and selfing syndrome can evolve without involving a pollinator decline. Paradoxically, no difference in floral traits is reported concerning *Viola arvensis* since its description in 1770. It is unlikely that *Viola arvensis* experienced the same rate of changes than during the last three decades since its description. Therefore, the estimation of model parameters, especially pollen discounting, have low power due to the low number of outcrossed offspring but it could also reflect the difficulty to capture potential of selfing evolution with current models.

Dissecting selfing syndrome evolution

Integrative traits such as biomass and floral display, likely highly polygenic, present the highest inbreeding depression as shown in other studies (Winn et al., 2011). The low or absent inbreeding depression of traits that show differences between ancestral and descendant populations (maximum of 6% nearly significant for floral area and 16% but non-significant for nectar volume) rules out that inbreeding depression is responsible of the observed differences and confirm evolution of traits (Acoca-Pidolle et al., 2024). Indeed, increase in selfing rates are of 27% in average and changes of floral area and nectar volume are of 10% and 20% respectively, inbreeding depression can explain 1.6% and 4.3% of changes respectively, therefore less than one fourth of the change.

Only traits linked to pollinator attraction show evolution (Acoca-Pidolle et al., 2024, Acoca-Pidolle et al., submitted). The absence of evolution on sepal length and rosette diameter despite their heritability and developmental proximity with petal length implies that selective pressures act specifically on petals (Breuninger and Lenhard, 2010). Despite effects of pollen:ovule ratio and mean number of apertures in selfing observed in another experiment and relatively high heritability, these traits do not show evolution (Acoca-Pidolle et al., submitted; Acoca-Pidolle & Cheptou, unpublished). For mean number of apertures, opposite effects of similar magnitude of male and female functions could explain the status of the trait (Acoca-Pidolle & Cheptou, unpublished). Concerning pollen:ovule ratio, the trait is likely blind for pollinators and thus not directly affected by pollinator declines inducing lower selective pressure on this trait than traits mediating plant-pollinator interactions directly. However, pollen:ovule ratio is a trait commonly associated to selfing syndrome (Lloyd, 1965; Cruden, 1977; Sicard and Lenhard, 2011), suggesting that it evolves secondarily likely during resource re-allocation permitted by decrease in investment in plant-pollinator interactions.

All these results reinforce the hypothesis that pollinator declines are the selective pressure responsible of the evolution of a selfing syndrome in *Viola arvensis*.

Limits of this study

This study is still in progress and has many limits. The relatively low number of outcrossed offspring compared to selfed ones limits the power of this study. It would be interesting to measure inbreeding depression and heritability for each population given differences of selfing rates in ancestral and descendant populations (Tisinai and Busch, 2024).

Estimation of genetic variance-covariances with inbreeding are necessary to better estimate the heritability. Indeed, inbreeding dominance variance and covariance between additive and dominance effects could be relatively high and can impact selective response of the population, at least for traits presenting inbreeding depression (Kelly, 1999; Kelly and Arathi, 2003). Estimation of genetic covariance between traits are also essential to understand genetic constraints to the evolution of selfing syndrome and ultimately estimate selective intensity imposed on traits (Ashman and Majetic, 2006; Sicard and Lenhard, 2011).

The next step of this study is to integrate information from comparison of relatives, parents and siblings, in a single Bayesian model to estimate together inbreeding depression, additive genetic variances and covariances of traits, if possible in each population.

Acknowledgments

The authors thank Patrice David for helpful discussion about estimation of quantitative genetic parameters, David Delguerde for construction and installation of insect-proof cages, Perrine Gauthier, Antoine Deverge Merdrignac, Louis Devresse, Virginie Pons, Sandrine Maurice, and Marine Fauché for help during data collection, Marie-Pierre Dubois and François Gatchitch for help during genotyping, Pauline Durbin, Fabien Lopez, and Thierry Mathieu for help in taking care of the plants during the experiment, the Conservatoire Botanique National de Bailleul and the Conservatoire Botanique National du Bassin Parisien for the supply of seeds and information on sampling locations. Genotyping data were obtained using technical facilities of GenSeq of the "Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier" with the support of LabEx CeMEB an ANR "Investissements d'avenir" program (ANR-10-LABX-04-01).

Competing interests

Authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

S.A.-P.: Conceptualisation, investigation, data collection, formal analysis, visualisation, writing. P.-O.C.: Conceptualisation, writing, supervision.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study will be openly available in data.InDoRES as soon as this study is published.

References

- S. Acoca-Pidolle, P. Gauthier, L. Devresse, A. Deverge Merdrignac, V. Pons et P.-O. Cheptou (2024). Ongoing convergent evolution of a selfing syndrome threatens plant-pollinator interactions. *New Phytologist*, 242(2):717–726. doi: 10.1111/nph.19422.
- T.-L. Ashman et C. J. Majetic (2006). Genetic constraints on floral evolution: a review and evaluation of patterns. *Heredity*, 96(5):343–352. doi: 10.1038/sj.hdy.6800815.
- S. C. H. Barrett (2002). The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, 3(4):274–284. doi: 10.1038/nrg776.
- D. Bates, M. Mächler, B. Bolker et S. Walker (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1):1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01.
- J. C. Biesmeijer, S. P. M. Roberts, M. Reemer, R. Ohlemüller, M. Edwards, T. Peeters, A. P. Schaffers, S. G. Potts, R. Kleukers, C. D. Thomas, J. Settele et W. E. Kunin (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313(5785):351–354. doi: 10.1126/science.1127863.
- S. A. Bodbyl Roels et J. K. Kelly (2011). Rapid evolution caused by pollinator loss in *Mimulus guttatus*. *Evolution*, 65(9):2541–2552. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01326.x.
- H. Breuninger et M. Lenhard (2010). Control of tissue and organ growth in plants. In *Plant Development*, pages 185–220. Elsevier, New York, USA. doi: 10.1016/S0070-2153(10)91007-7.
- R. Brys et H. Jacquemyn (2012). Effects of human-mediated pollinator impoverishment on floral traits and mating patterns in a short-lived herb: an experimental approach. *Functional Ecology*, 26(1):189–197. doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01923.x.
- D. Charlesworth et B. Charlesworth (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1):237–268. doi: 10.1146/annurev.es.18.110187.001321.
- P.-O. Cheptou, E. Imbert et M. Thomann (2022). Rapid evolution of selfing syndrome traits in *Viola arvensis* revealed by resurrection ecology. *American Journal of Botany*, 109(11):1838–1846. doi: 10.1002/ajb2.16028.
- C. C. Cockerham et B. S. Weir (1984). Covariances of relatives stemming from a population undergoing mixed self and random mating. *Biometrics*, 40(1):157. doi: 10.2307/2530754.
- R. W. Cruden (1977). Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31(1):32. doi: 10.2307/2407542.
- C. D. Darwin (1862). *On the various contrivances by which british and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing*. London.
- S. J. Franks, E. Hamann et A. E. Weis (2018). Using the resurrection approach to understand contemporary evolution in changing environments. *Evolutionary Applications*, 11(1):17–28. doi: 10.1111/eva.12528.

- S. T. Kalinowski, M. L. Taper et T. C. Marshall (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5): 1099–1106. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x.
- J. K. Kelly (1999). Response to selection in partially self-fertilizing populations. I. Selection on a single trait. *Evolution*, 53(2):336–349. doi: 10.1111/j.1558-5646.1999.tb03770.x.
- J. K. Kelly et H. S. Arathi (2003). Inbreeding and the genetic variance in floral traits of *Mimulus guttatus*. *Heredity*, 90(1):77–83. doi: 10.1038/sj.hdy.6800181.
- R. Lande et D. W. Schemske (1985). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution*, 39(1):24–40. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb04077.x.
- M. Latron, J.-F. Arnaud, H. Ferla, C. Godé et A. Duputié (2018). Polymorphic nuclear markers for coastal plant species with dynamic geographic distributions, the rock samphire (*Crithmum maritimum*) and the vulnerable dune pansy (*Viola tricolor subsp. curtisii*). *Molecular Biology Reports*, 45(3):203–209. doi: 10.1007/s11033-018-4153-4.
- D. G. Lloyd (1965). Evolution of self-compatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University*, (195):3–134.
- D. G. Lloyd (1992). Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, 153(3):370–380.
- R. J. Mitchell et T.-L. Ashman (2008). Predicting evolutionary consequences of pollinator declines: the long and short of floral evolution. *New Phytologist*, 177(3):576–579. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02354.x.
- R. Ornduff (1969). Reproductive biology in relation to systematics. *TAXON*, 18(2):121–133. doi: 10.2307/1218671.
- E. Porcher et R. Lande (2005). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression under pollen discounting and pollen limitation: pollination biology and evolution of selfing. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(3):497–508. doi: 10.1111/j.1420-9101.2005.00905.x.
- S. G. Potts, J. C. Biesmeijer, C. Kremen, P. Neumann, O. Schweiger et W. E. Kunin (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6):345–353. doi: 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- A. Scoppola et E. Lattanzi (2012). *Viola* section *Melanium* (Violaceae) in Italy. New data on morphology of *Viola tricolor*-Group. *Webbia*, 67(1):47–64. doi: 10.1080/00837792.2012.10670908.
- A. Scoppola et S. Magrini (2019). Comparative palynology and seed morphology in annual pansies (*Viola* sect. *Melanium*, Violaceae): implications for species delimitation. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153(6):883–899. doi: 10.1080/11263504.2019.1610113.
- A. Sicard et M. Lenhard (2011). The selfing syndrome: a model for studying the genetic and evolutionary basis of morphological adaptation in plants. *Annals of Botany*, 107(9):1433–1443. doi: 10.1093/aob/mcr023.
- A. Sicard, N. Stacey, K. Hermann, J. Dessoly, B. Neuffer, I. Bäurle et M. Lenhard (2011). Genetics, evolution, and adaptive significance of the selfing syndrome in the genus *Capsella*. *The Plant Cell*, 23(9):3156–3171. doi: 10.1105/tpc.111.088237.
- G. L. Stebbins (1957). Self fertilization and population variability in the higher plants. *The American Naturalist*, 91(861):337–354. doi: 10.1086/281999.

- M. Thomann, E. Imbert, C. Devaux et P.-O. Cheptou (2013). Flowering plants under global pollinator decline. *Trends in Plant Science*, 18(7):353–359. doi: 10.1016/j.tplants.2013.04.002.
- M. Thomann, E. Imbert, R. C. Engstrand et P.-O. Cheptou (2015). Contemporary evolution of plant reproductive strategies under global change is revealed by stored seeds. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(4):766–778. doi: 10.1111/jeb.12603.
- I. Till-Bottraud, A. Mignot, R. De Paepe et I. Dajoz (1995). Pollen heteromorphism in *Nicotiana tabacum* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 82(8):1040–1048. doi: 10.1002/j.1537-2197.1995.tb11569.x.
- S. L. Tisinai et J. W. Busch (2024). Weak response to selection on stigma-anther distance in a primarily selfing population of yellow monkeyflower. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 291(2025):20240586. doi: 10.1098/rspb.2024.0586.
- T. Van der Niet, R. Peakall et S. D. Johnson (2014). Pollinator-driven ecological speciation in plants: new evidence and future perspectives. *Annals of Botany*, 113(2):199–212. doi: 10.1093/aob/mct290.
- L. J. Weider, P. D. Jeyasingh et D. Frisch (2018). Evolutionary aspects of resurrection ecology: progress, scope, and applications-An overview. *Evolutionary Applications*, 11(1):3–10. doi: 10.1111/eva.12563.
- A. A. Winn, E. Elle, S. Kalisz, P.-O. Cheptou, C. G. Eckert, C. Goodwillie, M. O. Johnston, D. A. Moeller, R. H. Ree, R. D. Sargent et M. Vallejo-Marín (2011). Analysis of inbreeding depression in mixed-mating plants provides evidence for selective interference and stable mixed mating. *Evolution*, 65(12): 3339–3359. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01462.x.

Discussion générale



Alors que l'effondrement de la biodiversité est reporté partout dans le monde, comprenant le déclin des pollinisateurs (Biesmeijer et al., 2006 ; Potts et al., 2010), relativement peu d'études s'intéressent aux conséquences évolutives de cet effondrement sur la biodiversité elle-même (voir Thomann et al., 2013 pour le cas du déclin des pollinisateurs). Lorsqu'une espèce change ou disparaît, cela impacte nécessairement les partenaires avec qui elle est en interaction. Les interactions angiospermes-pollinisateurs en sont un bon exemple : si les pollinisateurs disparaissent, la reproduction des angiospermes est menacée. Les objectifs de cette thèse étaient d'observer les changements du système de reproduction d'une angiosperme au cours des dernières décennies, de comprendre la fonction de chaque trait impliqué dans ces changements, et enfin de comprendre quels étaient les moteurs de ces changements.

Dans le premier chapitre de cette thèse, l'augmentation du taux d'autofécondation a été mise en évidence en population naturelle, associée à une diminution de la taille des fleurs, des récompenses offertes et de leur attractivité, et ceci sans changement pour les traits végétatifs ou non-impliqués dans l'interaction avec les pollinisateurs. Les changements de traits étant mesurés en jardin commun, il est possible de conclure que les traits floraux ont connu une évolution rapide durant les dernières décennies (**Manuscrit 1**). Ces résultats démontrent l'évolution de la pensée des champs (*Viola arvensis*) vers plus d'autofécondation et le développement d'un syndrome d'autofécondation. Cette évolution est la même pour les quatre populations étudiées, ce qui appuie l'hypothèse qu'elle est le résultat d'une sélection induite par une pression présente sur l'ensemble de la zone d'étude. Cependant, le ratio pollen/ovule, un des traits impliqués dans la diagnose d'un syndrome d'autofécondation (Lloyd, 1965 ; Cruden, 1977 ; Sicard and Lenhard, 2011), ne montre quant à lui pas d'évolution claire même s'il semble, comme attendu, exister une tendance à la diminution masquée par de forts effets environnementaux (**Manuscrit 2**). Concernant l'hétéromorphisme pollinique, modulant la vitesse de germination et la viabilité des grains de pollen, aucune évolution ni du nombre moyen d'apertures, ni de la diversité de grains de pollen produits par un individu n'a été observée. En revanche, cette étude a permis de mieux comprendre ces deux facettes de l'hétéromorphisme pollinique en montrant notamment que, bien que la production de trois morphes de pollen par un même individu soit possible, les individus produisent principalement deux morphes n'ayant qu'une apertures de différence, *i.e.* 4 et 5 apertures, ou 5 et 6 apertures (**Manuscrit 2**).

Le deuxième chapitre de cette thèse (**Manuscrit 3**) a mis en évidence que l'augmentation du taux d'autofécondation est bien une évolution de la propension à l'autofécondation, et pas seulement le produit direct d'une moindre pollinisation. Les résultats démontrent également que les traits impliqués dans le syndrome d'autofécondation modulent la réalisation de l'autofécondation. En revanche, seul le nombre de guides nectarifères favorise l'autofécondation par les deux fonctions sexuelles, mâle et femelle. Certains traits montrent, au contraire, des effets opposés sur la capacité à l'autofécondation selon la fonction sexuelle. C'est le cas du nombre moyen d'apertures. Les individus produisant des grains de pollen avec beaucoup d'apertures ont plus de chances de féconder les ovules d'individus produisant peu d'apertures avec leur pollen, mais ont également moins de chances de voir leurs ovules allofécondés. Inversement, les individus ayant des grains de pollen avec peu d'apertures ont peu de chances de féconder d'autres individus *via* leur pollen mais ont plus de chance de voir leurs ovules fécondés par d'autres individus. Cela démontre que l'hétéromorphisme pollinique entraîne de la compétition gamétophytique, et que cette compétition peut jouer un rôle important dans la réalisation

de l'autofécondation (Dajoz et al., 1993). Ce chapitre montre également que les traits impliqués dans le syndrome d'autofécondation peuvent modifier la capacité à l'autofécondation en modifiant l'interaction avec les pollinisateurs mais aussi indépendamment de ces interactions, comme c'est le cas pour le ratio pollen/ovule ou l'hétéromorphisme pollinique par exemple. De plus, certains traits ont une fonction qui s'exprime de manière relative aux autres individus présents dans la population ou bien de manière absolue, indépendamment des autres individus de la population. Cette fonction selon la valeur relative ou absolue du trait renvoie respectivement aux concepts de sélections douce et dure, qui a des conséquences démographiques mais également évolutives (*soft and hard selection*, Wallace, 1975 ; Bell et al., 2021). Un trait lié à l'attraction des pollinisateurs de manière absolue implique une augmentation de l'autofécondation en cas de diminution de la valeur du trait, indépendamment de l'abondance de pollinisateurs. En revanche, un trait lié à l'attraction des pollinisateurs de manière relative implique une autofécondation stable, peu importe la valeur moyenne du trait au sein de la population. Cela suggère une réversibilité de l'évolution plus difficile pour les traits fonctionnant de manière absolue.

Enfin le troisième et dernier chapitre de cette thèse (**Manuscrit 4**) montre que l'évolution rapide vers l'autofécondation, et le syndrome associé, sont facilités par une faible dépression de consanguinité, et une forte héritabilité des traits impliqués. Cependant, d'autres traits, qui ne présentent pas d'évolution, possèdent également une forte héritabilité, ce qui indique qu'ils ne subissent pas ou peu de sélection directionnelle sur l'échelle de temps observée. L'absence d'évolution claire du ratio pollen/ovule généralement associé au syndrome d'autofécondation, malgré son héritabilité non nulle, laisse penser que le syndrome d'autofécondation ne se met pas en place à la même vitesse pour tous les traits. Enfin l'absence d'évolution des tailles de feuille ou de sépale malgré leur forte héritabilité, montre l'absence de sélection directionnelle sur ces traits. Cela conforte l'hypothèse selon laquelle le déclin des pollinisateurs est responsable de l'évolution des traits floraux médiant l'interaction avec les pollinisateurs et de l'augmentation de l'autofécondation observées dans le premier chapitre.

La discussion suivante s'attache à faire ressortir trois points relativement indépendants qui me paraissent émerger des résultats de cette thèse. Le premier relève l'importance de l'intégration des disciplines que constituent l'évolution et l'écologie. Le deuxième questionne le syndrome d'autofécondation, sa composition et sa dynamique. Enfin, le troisième point s'ouvre sur les apports de ce travail à la compréhension de l'évolution des systèmes de reproduction à l'échelle macroévolutive.

I De l'importance d'intégrer les dynamiques évolutives dans les dynamiques écologiques

I.1 Le déclin des pollinisateurs, pression de sélection supposée ou démontrée

Le déclin des pollinisateurs a été pris comme hypothèse de travail au début de cette thèse. Il y a un manque de données historiques permettant d'identifier les dynamiques de populations de pollinisateurs et de la pollinisation en France, que ce soit à l'échelle locale ou nationale. Quelques études ont essayé de les quantifier de manière indirecte, notamment en analysant les rendements agricoles en fonction de leur dépendance aux pollinisateurs, en vain, la discontinuité des méthodes utilisées pour constituer ces données ne permettant pas d'étudier des tendances temporelles sur plus de dix ans (Martin et al.,

2019). Cependant, une tendance au déclin des rendements pour certaines cultures très dépendantes des pollinisateurs, comme le kiwi, est observée. Bien qu'élégante, l'analyse des rendements est également limitée par la supplémentation en pollinisateurs, *via* l'introduction de pollinisateurs issus d'élevages dans les parcelles, pratique courante dans les cultures très dépendantes des pollinisateurs. Le problème réside dans l'estimation d'une valeur de référence, avant l'utilisation massive d'insecticides de synthèse par exemple (Goulson et al., 2015 ; Janousek et al., 2023). Une des perspectives les plus prometteuses semble être l'utilisation des radars, dont des données existent au moins depuis les années 70, pour estimer l'abondance d'insectes malgré les nombreux biais que cela comporte (Bauer et al., 2024).

L'absence d'évolution de la taille des sépales alors que son héritabilité est relativement élevée et plus généralement l'évolution exclusivement des traits médiant l'interaction avec les pollinisateurs sont des éléments qui étayaient l'idée que le déclin des pollinisateurs est responsable de l'évolution observée chez *Viola arvensis*. Cependant, en l'absence de données sur les pollinisateurs, il est difficile d'inférer que le déclin est bel et bien la cause de cette évolution, et cela reste une hypothèse. Une manière d'asseoir ce résultat serait de mesurer en conditions expérimentales les intensités de sélection imposées sur les traits en présence ou en absence de pollinisateurs, pour les comparer à celles mesurées dans la nature (Galen, 1989 ; Fishman and Willis, 2008). Une expérience préliminaire réalisée lors du stage de première année de Master de Thomas Lejeune, co-encadré avec Pierre-Olivier Cheptou, visait à quantifier les gradients de sélection sur les différents traits en présence ou en absence de pollinisateurs. L'expérience était constituée de deux blocs de 30 individus de *Viola arvensis* aux phénotypes contrastés, dont nous mesurions les traits et récoltions des fruits issus de fécondation en absence ou en présence de bourdons. Les résultats tendent à montrer que l'absence de pollinisateurs contre-sélectionne les grandes fleurs produisant de nombreux guides tandis que leur présence sélectionne positivement ces traits. En revanche, la présence ou non de pollinisateurs n'a aucun effet sur la taille des sépales. Ces résultats semblent donc confirmer que l'absence de pollinisateurs sélectionne le patron observé dans la nature. Une comparaison des intensités de sélection de ces traits en conditions contrôlées et dans la nature pourrait renseigner sur le niveau de pression de sélection imposé par le déclin des pollinisateurs et donc la magnitude de celui-ci. Connaissant les gradients de sélection et l'héritabilité des traits, la mesure des traits floraux, plus facile à obtenir dans le passé grâce à l'écologie de la résurrection (Franks et al., 2018 ; Weider et al., 2018), pourrait même être utilisée pour inférer les variations de pression de sélection imposée par les pollinisateurs sur l'espèce étudiée, et donc leur potentiel déclin.

Le fait que le déclin des pollinisateurs puisse théoriquement être une pression de sélection pour les angiospermes a déjà été démontré expérimentalement (Bodbyl Roels and Kelly, 2011 ; Thomann et al., 2013), l'originalité de cette thèse est de montrer que c'est bien le cas dans la nature. Le déclin actuel et global des pollinisateurs impliquerait donc des réponses non seulement démographiques (Biesmeijer et al., 2006) mais également évolutives chez les angiospermes.

I.2 L'adaptation au déclin des pollinisateurs, bonne ou mauvaise nouvelle

L'évolution du système de reproduction des angiospermes vers plus d'autofécondation en réponse au déclin des pollinisateurs peut sembler être une bonne nouvelle. En effet, l'évolution permet de maintenir la reproduction et donc la démographie de la population, c'est un exemple de sauvetage évolutif (Figure 1 ; Gonzalez et al., 2013 ; Bell, 2017). Cependant, l'augmentation de l'autofécondation ne sauve pas nécessairement la population. En effet, quand bien même l'augmentation de l'autofécondation

est sélectionnée car elle implique une transmission d'allèles plus importante, l'augmentation de la dépression de consanguinité associée peut diminuer le taux d'accroissement de la population, induisant un déclin démographique pour une population initialement à l'équilibre (Figure 1). L'évolution vers l'autofécondation constitue alors un suicide évolutif (Cheptou, 2019).

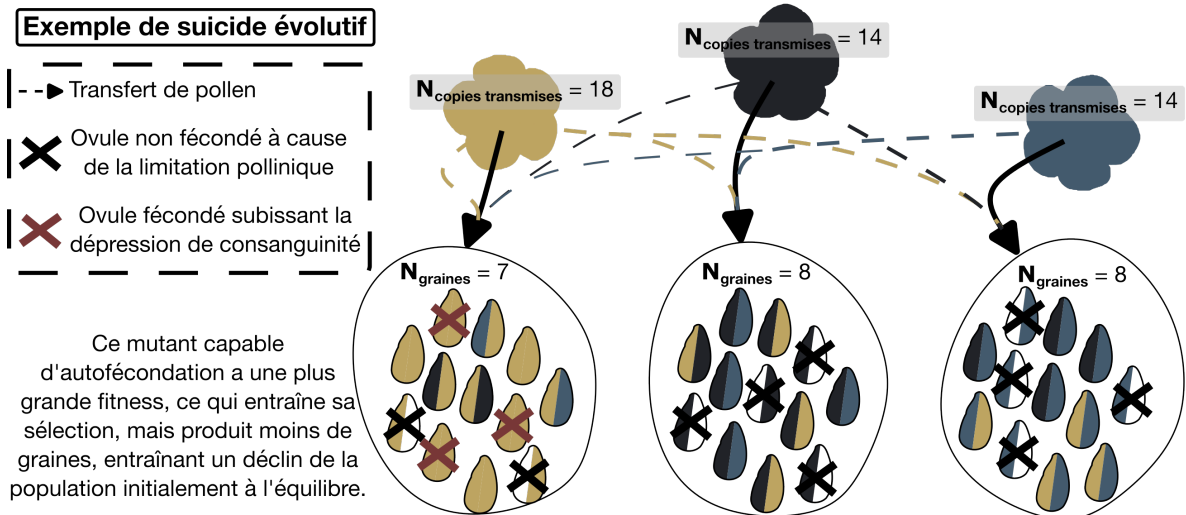
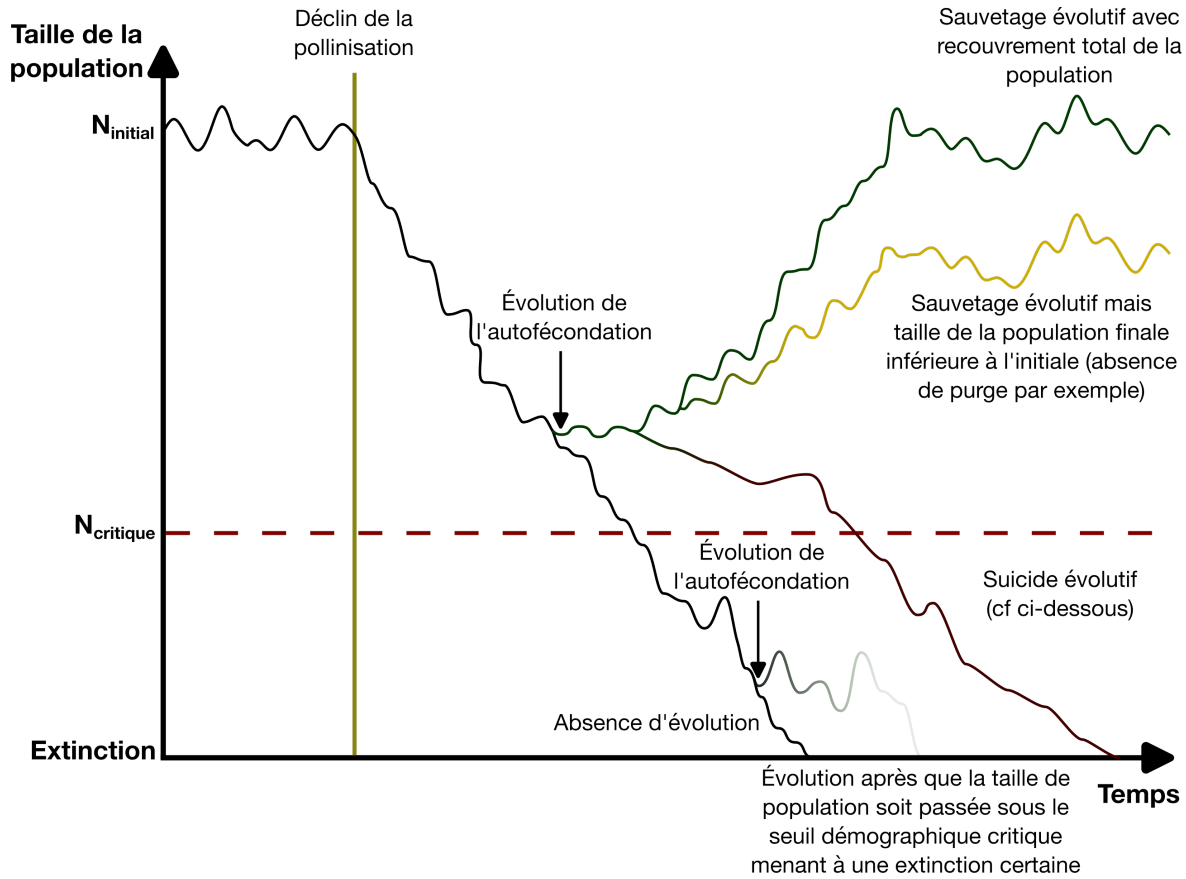


Figure 1 : Dynamiques possibles d'une population d'angiosperme suite à un déclin des pollinisateurs

Si l'augmentation de l'autofécondation est avantageuse et permet de maintenir la population dans un premier temps, il est probable que cela soit malgré tout un cul-de-sac évolutif (Stebbins, 1957 ; Takebayashi and Morrell, 2001). En effet, la réduction de la taille efficace induite par l'autofécondation sur plusieurs générations limite le potentiel évolutif des populations et augmenterait donc leur risque d'extinction (Dobzhansky, 1950 ; Stebbins, 1957 ; Glémin et al., 2006 ; Glémin and Ronfort, 2013 ; Noël et al., 2017). Cette réduction de la taille efficace limite aussi la capacité de purge de mutations faiblement délétères qui induirait alors une augmentation du fardeau génétique pouvant mener à l'extinction. Cependant, relativement peu d'études montrent des traces de l'atténuation de l'adaptation chez les populations autogames (Igic and Busch, 2013). Malgré tout, les études phylogénétiques montrent que les espèces autogames sont généralement récentes (Fuxe et al., 2009). De plus, ces espèces présentent un taux d'extinction plus élevé que les espèces allogames, et même un taux de diversification, qui correspond à la différence entre le taux de spéciation et le taux d'extinction, négatif (Figure 2 ; Goldberg et al., 2010). La disparition des espèces autogames semble donc certaine.

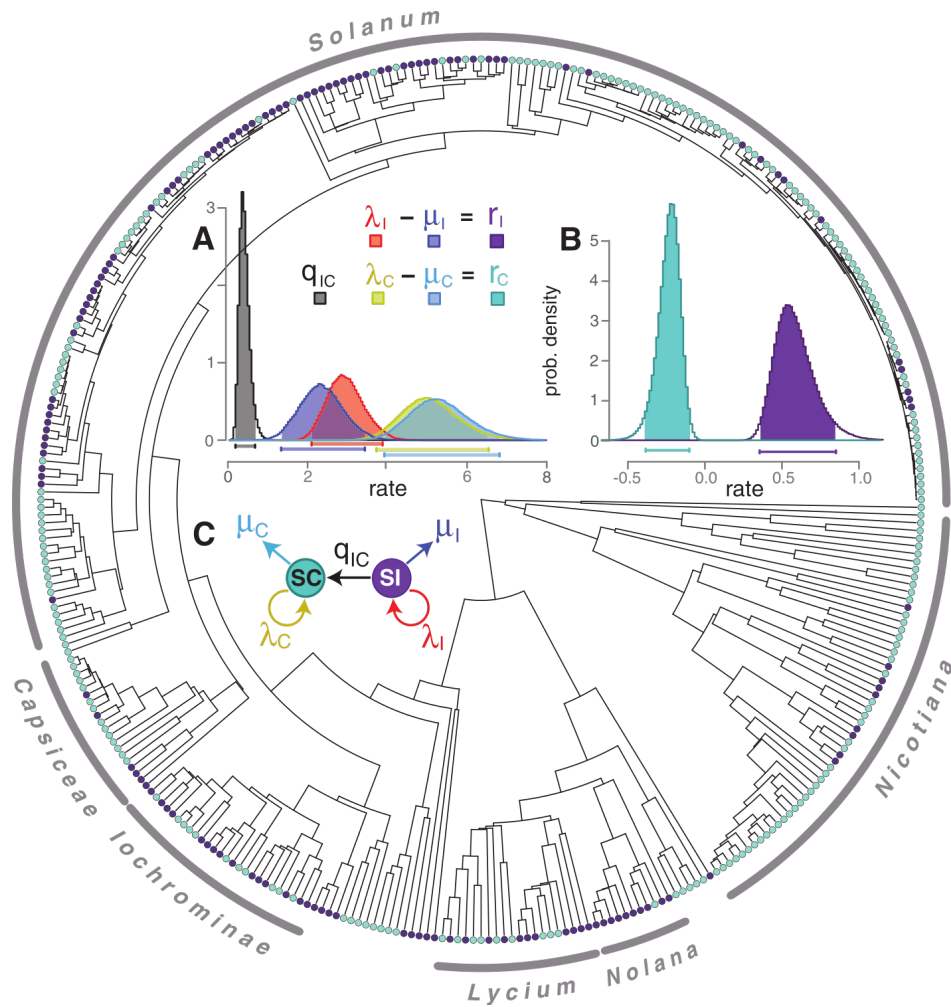


Figure 2 : Phylogénie des Solanacées et évolution de leur autoincompatibilité
 Les espèces autoincompatibles (SI) sont en violet et les autocompatibles (SC) en turquoise. (A) Taux de spéciation (λ), d'extinction (μ) et de transition (q) et (B) taux de diversification (r) inférés en estimant les paramètres du modèle (C) sur la phylogénie. Tiré de Goldberg et al. (2010), avec la permission de AAAS.

Pour caractériser un cul-de-sac évolutif, l'extinction certaine de la lignée ne suffit pas, il faut également que l'évolution menant au cul-de-sac soit irréversible (Takebayashi and Morrell, 2001). L'irréversibilité de l'évolution vers l'autofécondation pour les plantes entomogames nécessite une perte irréversible de l'interaction avec les pollinisateurs. Comme montré dans cette thèse, la perte d'interaction est vraisemblablement progressive et favorisée par le développement du syndrome d'autofécondation, induisant une diminution de l'attractivité et des récompenses pour les pollinisateurs. La possibilité d'une ré-augmentation de l'attractivité avant la perte totale de l'interaction est une question en suspens. Si les traits permettant l'interaction sont sélectionnés de manière douce par les pollinisateurs, *i.e. via* leurs valeurs relatives au sein de la population et quelle que soit la valeur moyenne des traits dans la population, les individus sélectionnés obtiendront le nombre maximum de fécondations possibles par les pollinisateurs. En cas d'augmentation du nombre de fécondations possibles par les pollinisateurs, suite à une augmentation de l'abondance des pollinisateurs par exemple, cela diminuera l'avantage de l'autofécondation pour les individus sélectionnés, peu importe la valeur absolue de leurs traits. En revanche si les traits sont sélectionnés de manière dure, *i.e.* relativement à leurs valeurs absolues, en dessous d'une certaine valeur, les individus sélectionnés ne réalisent pas le maximum de fécondations possibles par les pollinisateurs, induisant un avantage supplémentaire à l'autofécondation. Dans un contexte de sélection dure des traits par les pollinisateurs, en dessous d'un certain seuil de valeur du trait, l'autofécondation est donc favorable à tous les individus de la population, peu importe l'abondance des pollinisateurs, et évolue donc de manière irréversible. La réversibilité de l'évolution vers un syndrome d'autofécondation est donc dépendante du régime de sélection imposé aux traits (Wallace, 1975 ; Bell et al., 2021). Or, cette thèse montre que les traits constituant le syndrome d'autofécondation semblent plutôt sous sélection dure, favorisant l'irréversibilité de leur évolution. Cela implique que les mesures de conservation permettant de freiner et d'inverser le déclin des pollinisateurs pourraient ne pas être suffisantes pour enrayer la rupture de l'interaction plante-pollinisateurs pour les espèces déjà trop engagées dans l'évolution d'un syndrome d'autofécondation. Cependant, le comportement et les préférences des pollinisateurs sont ici considérés comme fixes, alors que ces derniers peuvent changer en réponse aux changements des traits. Il est nécessaire de mieux comprendre les facteurs de choix pour les pollinisateurs, conduisant à la pollinisation ou non d'une fleur, pour mieux comprendre l'évolution vers l'autofécondation et sa potentielle irréversibilité. Les populations de *Viola arvensis* étudiées lors de cette thèse représentent un matériel intéressant pour effectuer de l'évolution expérimentale sous des intensités de pollinisation variables afin de tester cette hypothèse d'irréversibilité.

L'évolution d'un syndrome d'autofécondation, avec la réduction des récompenses, constitue également une menace pour les pollinisateurs. En effet, la diminution relative de la production de nectar mesurée dans cette étude est du même ordre que celle liée au changement des communautés végétales (Baude et al., 2016), pointée comme un des facteurs responsables du déclin des pollinisateurs (Goulson et al., 2015). L'évolution du syndrome d'autofécondation chez les plantes pourrait donc renforcer les menaces pesant sur les dynamiques de population des pollinisateurs (Weinbach et al., 2022), illustrant une boucle de rétrocontrôle positif du déclin sur lui-même (**Figure 3**). Cependant, *Viola arvensis* ne possède pas de pollinisateur spécialiste, ses pollinisateurs vont donc probablement se détourner de cette espèce au profit d'autres espèces de la communauté apportant plus de récompenses. Cette compétition peut renforcer l'évolution de *Viola arvensis* vers l'autofécondation (Mitchell et al., 2009), mais limiter son impact sur les pollinisateurs. Cependant, si les résultats observés pour *Viola arvensis* sont également

observés pour d'autres espèces, 50% des angiospermes étant capables d'autofécondation (Ilgic and Kohn, 2006), l'évolution vers l'autofécondation pourrait être à l'origine d'une chute importante des ressources florales.

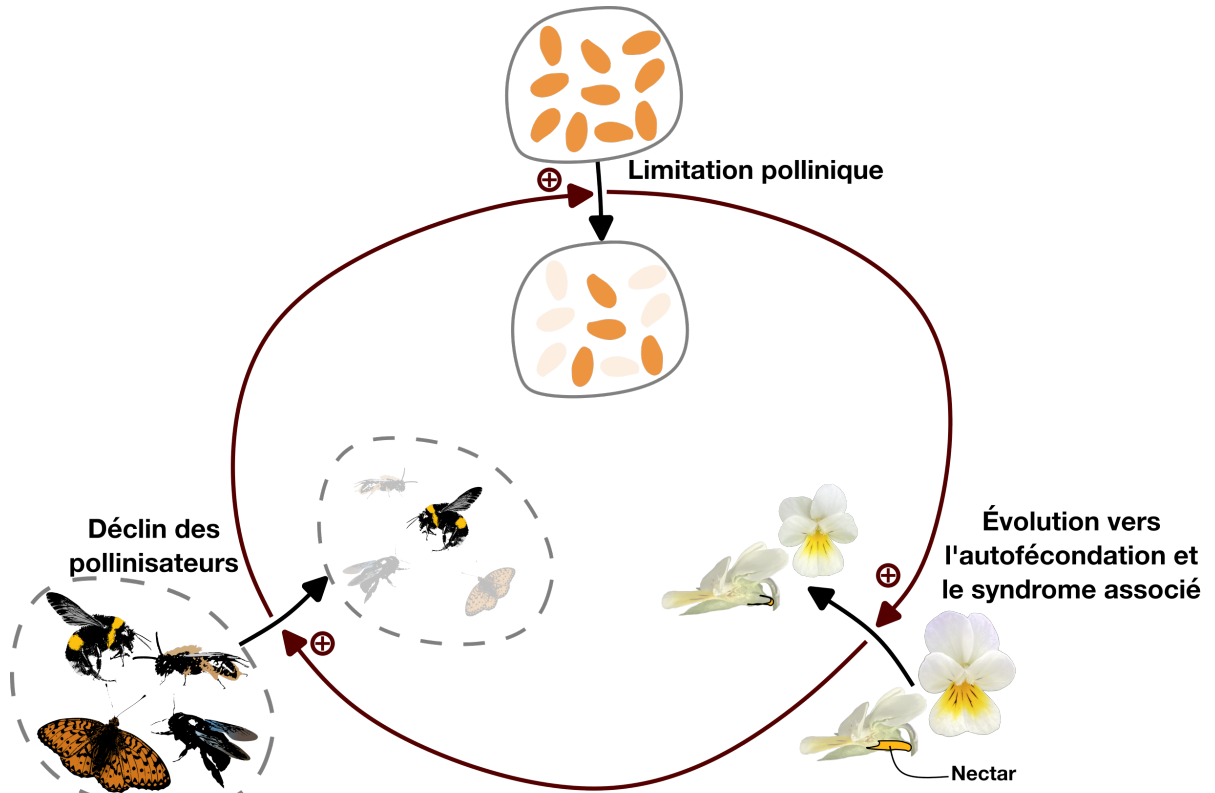


Figure 3 : Boucle supposée de rétrocontrôle positif sur le déclin des pollinisateurs *via* la diminution des ressources induite par le syndrome d'autofécondation

L'évolution du système de reproduction vers l'autofécondation et du syndrome associé menace la diversité intraspécifique des plantes concernées, les interactions entre les plantes et les pollinisateurs, et même les espèces de pollinisateurs, voire de plantes à plus long terme, soit tous les niveaux de la biodiversité.

II Le syndrome d'autofécondation, un ensemble composite

Le syndrome d'autofécondation est constitué d'un ensemble de traits allant de l'autocompatibilité à la taille de la corolle en passant par le ratio pollen/ovule ou l'herkogamie. Il est souvent vu comme un état final et peu d'études caractérisent les fonctions des traits du syndrome d'autofécondation dans la capacité à l'autofécondation (voir cependant Sicard et al., 2011). Ce syndrome est généralement observé en comparant plusieurs espèces ou populations et en corrélant leur taux d'autofécondation avec leurs traits (Sicard et al., 2011). De plus, peu de populations en cours de développement du syndrome d'autofécondation ont été étudiées et aucune n'était une population naturelle. Le matériel de cette thèse

est donc précieux pour comprendre le rôle des traits impliqués dans le syndrome d'autofécondation et sa mise en place.

II.1 Des traits favorisant l'autofécondation de manière différente

Les résultats présentés dans le deuxième chapitre démontrent que parmi les traits composant le syndrome d'autofécondation, certains affectent l'autofécondation en modulant l'interaction avec les pollinisateurs, tandis que d'autres affectent l'autofécondation tout en étant aveugles aux pollinisateurs. C'est le cas de l'autoincompatibilité, l'herkogamie ou encore le ratio pollen/ovule. Ces traits modulent le taux d'autofécondation *via* la capacité intrinsèque à l'autofécondation, indépendamment du contexte de pollinisation. En revanche, l'affichage floral, la taille de corolle, le nombre de guides nectarifères, ou encore la quantité de nectar, en impactant l'interaction avec les pollinisateurs, modulent l'autofécondation en fonction de l'activité de ces derniers (autofécondation induite). Les traits conférant une capacité intrinsèque à l'autofécondation sont essentiels à la réalisation de l'autofécondation. Ces traits sont suffisants pour expliquer l'autofécondation réalisée en cas d'autofécondation obligatoire mais, en cas d'autofécondation facultative, il est nécessaire d'intégrer la limitation à l'allofécondation due aux comportements des pollinisateurs (autofécondation induite). En effet, si les pollinisateurs ne sont pas limitants, l'autofécondation induite est nulle et quand bien même la capacité à l'autofécondation est maximale, l'autofécondation réalisée sera également nulle.

Les traits médiant l'interaction plante-pollinisateurs sont généralement présentés comme coûteux et un relâchement de la pression de sélection exercée par les pollinisateurs suffirait donc à les faire évoluer vers le syndrome d'autofécondation (Pyke, 1991). La question du coût des traits est complexe et mérite d'être proprement testée, afin de savoir si le relâchement de la pression de sélection imposée par les pollinisateurs est suffisant pour obtenir une régression totale. Une expérience de gradient de sélection en présence et en absence de pollinisateurs pour les traits floraux constituant le syndrome d'autofécondation offrirait de nombreuses informations sur la question. L'expérience préliminaire réalisée dans le cadre du stage de Thomas Lejeune semble montrer que certains traits floraux, comme le nombre de guides nectarifères, présentent bel et bien un coût en l'absence de pollinisateurs. Il est intéressant de noter ici que, lorsque l'autofécondation n'est pas permise ou pas favorable, ce sont au contraire les individus les plus attractifs qui vont être sélectionnés suite à la pression induite par la raréfaction des pollinisateurs (Thomann et al., 2015). En revanche, cela induit une augmentation des coûts liés aux traits d'attraction qui rend probablement ces populations plus vulnérables à l'invasion par des mutants autogames.

L'origine du relâchement de la pression de sélection imposée par les pollinisateurs, en cas de capacité d'autofécondation, est la conséquence de l'augmentation de l'avantage de l'autofécondation, qui peut être indépendante de la dynamique des pollinisateurs *via* la diminution de la dépression de consanguinité par exemple, ou bien faire suite à l'augmentation de la limitation pollinique liée au déclin des pollinisateurs (Lloyd, 1992). Ces scénarios sont difficiles à distinguer en l'absence de série temporelle. Seules des mesures d'intensité de sélection et de dépression de consanguinité, comme proposées dans le troisième chapitre, combinées à des modèles théoriques de vitesse d'évolution selon un scénario ou l'autre, pourraient permettre de les départager. Le relâchement suite à une perte de pollinisateurs est vraisemblablement plus soudain et plus important mais cela demande d'être testé formellement.

II.2 Une séquence évolutive amenant au syndrome d'autofécondation

Le syndrome d'autofécondation est rarement observé au cours de son développement. Les résultats de cette thèse présentent deux instantanés lors de cette transition. Les traits favorisant la capacité intrinsèque à l'autofécondation sont un pré-requis au développement du syndrome d'autofécondation. Chez *Mimulus guttatus*, initialement peu capable d'autofécondation, l'herkogamie évolue en à peine cinq générations en absence de pollinisateurs de manière corrélée à la capacité d'autofécondation (Bodbyl Roels and Kelly, 2011). Les traits favorisant la capacité intrinsèque à l'autofécondation sont donc vraisemblablement les premiers du syndrome d'autofécondation à évoluer. Cela est cohérent avec le fait que ces derniers peuvent être sélectionnés même si la dépression de consanguinité est élevée, grâce à l'assurance de reproduction qu'ils offrent (Lloyd, 1992).

Notre étude montre que les traits médiant l'interaction avec les pollinisateurs peuvent évoluer rapidement chez les espèces déjà capables d'autofécondation. Cette évolution rapide est favorisée par deux facteurs, une faible dépression de consanguinité et une forte héritabilité des traits dans les populations étudiées. La faible dépression peut résulter d'une purge préalable, l'espèce étant déjà partiellement autogame avant le déclin, possible même sous de faibles taux d'autofécondation (Lande and Schemske, 1985 ; Charlesworth and Charlesworth, 1987 ; Winn et al., 2011). Malgré l'augmentation importante de l'autofécondation, aucune purge n'est observée dans les populations étudiées, ce qui suggère que, contrairement aux modèles, la dépression de consanguinité n'est pas nécessaire à l'équilibre avec le taux d'autofécondation (Lande and Schemske, 1985 ; Charlesworth and Charlesworth, 1987 ; Winn et al., 2011). Cela peut aussi être dû à la faible dépression déjà présente dans les populations ancestrales, limitant la baisse possible.

La forte héritabilité des traits floraux est commune chez les angiospermes, où un grand nombre de gènes est généralement responsable de leurs variations (Ashman and Majetic, 2006 ; Sicard and Lenhard, 2011). Les différences de vitesse d'évolution entre traits peuvent être liées à ces différences d'héritabilité, mais également à une sélection différente par les fonctions mâle et femelle. En effet, les résultats du deuxième chapitre de cette thèse montrent que le nombre moyen d'ouvertures des grains de pollen est un facteur explicatif important de la réalisation de l'autofécondation par les fonctions mâle et femelle. Cependant, les deux fonctions sexuelles sont opposées, avec un nombre d'ouvertures élevé favorisant l'autofécondation par la fonction femelle mais la défavorisant par la fonction mâle. Cette opposition des deux fonctions sexuelles pourrait expliquer la stase évolutive observée dans le premier chapitre malgré l'héritabilité élevée mesurée dans le troisième chapitre. *A contrario*, le nombre de guides favorisant l'autofécondation de manière concordante *via* les deux fonctions sexuelles montre une forte évolution malgré une héritabilité similaire à celle du nombre moyen d'ouvertures.

Un autre paramètre important pour comprendre une évolution synchrone des traits est la corrélation entre ceux-ci. En effet, les traits floraux sont généralement hautement corrélés, ce qui peut être dû à une forte liaison des gènes codant ces traits ou bien à de la pléiotropie, *i.e.* à l'action d'un seul gène sur plusieurs traits (Ashman and Majetic, 2006 ; Sicard and Lenhard, 2011). L'importance relative de ces deux phénomènes est difficile à estimer et semble être dépendante du modèle étudié (Sicard and Lenhard, 2011). L'absence d'évolution de la taille du sépale ou des feuilles malgré la diminution de la taille des pétales, alors que l'ontogenèse est similaire pour ces différents organes, a été observée chez *Viola arvensis* et en général chez les espèces présentant le syndrome d'autofécondation. Cela indique que le syndrome se met en place de manière fine sur quelques organes floraux. Cette absence de changement

est d'autant plus surprenante que chez les organismes modèles, les mutants dont la taille des pétales est affectée sont aussi systématiquement affectés pour la taille de leurs feuilles (Breuninger and Lenhard, 2010 ; Sicard and Lenhard, 2011).

L'absence d'évolution claire du ratio pollen/ovule, malgré une tendance à la baisse, nous permet de faire l'hypothèse que ce trait est parmi les derniers du syndrome d'autofécondation à évoluer. Cela est cohérent avec le fait qu'il n'affecte pas directement l'autofécondation (**Manuscrit 3**) et s'ajuste donc dans un second temps aux changements d'efficacité de la pollinisation ou de gains liés aux deux fonctions sexuelles (Cruden, 1977 ; Charnov, 1982). Les pressions de sélection liées à ces changements demandent à être quantifiées, mais sont probablement relativement faibles par rapport à celles qui pèsent sur les autres traits du syndrome. La baisse du ratio pollen/ovule peut se faire par deux voies, la diminution de la quantité de pollen ou l'augmentation du nombre d'ovules. Les populations étudiées dans cette thèse semblent montrer que les deux voies évolutives peuvent être empruntées. Cependant, il est intéressant de noter que l'augmentation du nombre d'ovules ne se fait que dans les populations ayant subi la plus forte diminution de l'aire florale. Cela peut être dû à une réallocation des ressources des organes floraux vers l'ovaire pour augmenter le nombre d'ovules produits.

Les traits constituant le syndrome d'autofécondation possèdent des fonctions différentes et n'évoluent pas de manière synchrone. Mieux comprendre les fondements génétiques de ces changements et leur vitesse est fondamental pour essayer d'évaluer l'irréversibilité de cette évolution.

III Et quand l'humain n'est pas responsable

La transition de l'allofécondation vers l'autofécondation est une des transitions les plus fréquentes chez les angiospermes (Stebbins, 1957 ; Barrett, 2010). Le déclin actuel des pollinisateurs, lié aux activités humaines (Goulson et al., 2015 ; Janousek et al., 2023), est vraisemblablement responsable de l'évolution récente vers l'autofécondation des populations de *Viola arvensis* étudiées dans cette thèse, et pourrait être responsable d'une évolution similaire chez d'autres espèces. Cependant, l'évolution vers l'autofécondation est, pour de nombreuses espèces, antérieure aux impacts humains (Tang et al., 2007 ; Foxe et al., 2009), ce qui amène à se questionner sur ce qui a conduit à ces transitions (Igic and Busch, 2013).

III.1 Certains traits favorables à l'évolution vers l'autofécondation

La famille des Solanacées a été largement étudiée pour tester l'hypothèse de l'autofécondation comme cul-de-sac évolutif (**Figure 2** ; Igic et al., 2006 ; Goldberg et al., 2010). Cependant cette famille, présentant plusieurs dizaines de transitions de l'autoincompatibilité vers l'autocompatibilité, caractère utilisé comme proxy de l'état allogame ou autogame, a été relativement peu utilisée pour comprendre ce qui conduisait à l'évolution vers l'autofécondation. Seule une étude s'intéresse à l'interaction entre la capacité de reproduction asexuée et l'évolution vers l'autocompatibilité (Vallejo-Marín and O'Brien, 2007). La clonalité apportant déjà une assurance de reproduction, l'autoincompatibilité a plus de chances d'être conservée chez les espèces clonales. Cependant, si la clonalité n'est pas ancestralement associée à l'autoincompatibilité et constitue un caractère dérivé, les espèces autoincompatibles non clonales

ont vraisemblablement plus de chance que les espèces autoincompatibles clonales d'évoluer vers l'autocompatibilité afin de pallier d'éventuelles limitations polliniques. Cet exemple met en évidence que certains traits peuvent entrer en interaction avec l'évolution du système de reproduction.

La publication récente d'une phylogénie bien résolue du genre *Solanum* (Solanaceae) et d'un ensemble de traits pour les espèces présentes dans la phylogénie est un matériel intéressant pour tenter d'en savoir plus sur les interférences entre les traits et l'évolution du système de reproduction (Gagnon et al., 2022 ; Hilgenhof et al., 2023). La connaissance des traits actuels permet d'identifier des traits corrélés à la présence ou non de l'autoincompatibilité, et de voir si cette corrélation est dépendante de la durée depuis laquelle elle a été perdue. Cela nous informerait sur la généralisation du syndrome d'autofécondation ainsi que, potentiellement, sa mise en place. Les nouvelles méthodes de reconstruction des caractères le long des phylogénies permettent d'inférer l'état des traits au moment de la transition vers l'autocompatibilité (Maddison et al., 2007 ; Quintero et al., 2023). Cela permettrait de détecter si certains traits, comme l'absence de reproduction asexuée, l'annualité, la monocarpie ou encore une faible herkogamie, sont particulièrement favorables à l'évolution vers l'autofécondation. La monocarpie ou l'annualité sont de bons candidats car ils rendent la période de reproduction des individus particulièrement sensible aux variations temporelles de la pollinisation, étant unique ou limitée dans le temps, ce qui augmente l'avantage fourni par l'assurance de reproduction liée à l'autofécondation (Barrett et al., 1996).

Le nombre d'espèces de pollinisateurs associées à une plante donnée est également un élément à prendre en compte. Les plantes pollinisées par peu d'espèces de pollinisateurs ont probablement plus de risques de présenter une forte limitation pollinique à la suite d'une variation environnementale. En effet, les plantes pollinisées par plusieurs espèces de pollinisateurs ont plus de chances que certains de leurs pollinisateurs ne subissent pas ou peu cette variation.

III.2 Les paramètres extérieurs favorables à l'autofécondation

Comme discuté précédemment, les causes de l'évolution vers l'autofécondation sont complexes. Les modèles théoriques prédisent que pour un espace des paramètres relativement large, l'autofécondation devrait être sélectionnée. Cependant aucune expérience ne montre une évolution vers l'autofécondation ou le syndrome d'autofécondation en absence de changement de conditions environnementales. Il serait donc intéressant de reconstruire les conditions environnementales au moment des transitions vers l'autofécondation, en reconstruisant la paléobiogéographie des espèces tout en intégrant des reconstructions paléogéographique et paléoclimatique (Quintero et al., 2023). L'absence de détection de conditions environnementales particulières associées à la transition vers l'autofécondation pourrait impliquer que la transition vers l'autofécondation est indépendante d'une augmentation de la limitation pollinique liée à un changement environnemental. D'après les modèles théoriques, l'avantage automatique à l'autofécondation est suffisant pour évoluer vers l'autofécondation (Lloyd, 1992). La transition serait alors dépendante de l'apparition de mutations permettant l'autofécondation, avec une perte pollinique suffisamment faible, chez des individus ayant un fardeau génétique également suffisamment bas pour induire une dépression faible dans la descendance, et envahir la population indépendamment de la présence ou non de limitation pollinique. Cette hypothèse est à mettre en regard avec l'estimation de 0,5 transition par million d'années par lignée, obtenue en prenant comme proxy la perte de l'autoincompatibilité chez les Solanacées (Figure 2 ; Goldberg et al., 2010). Tandis que les

modèles évolutifs considèrent souvent la transition vers l'autofécondation comme indépendante de l'environnement (mutation, dépression de consanguinité, purge), il est probable qu'il faille intégrer les dynamiques écologiques pour la compréhension de cette dynamique évolutive.

Cette thèse soutient l'hypothèse que la limitation pollinique, induite par une diminution ou une rupture de l'interaction avec les pollinisateurs, est régulièrement à l'origine de l'évolution vers l'autofécondation. Les conditions amenant à cette rupture peuvent être nombreuses, des périodes d'aridification ou de glaciation amenant à un isolement des plantes vis-à-vis de leurs pollinisateurs pourraient être des moments où le taux d'évolution vers l'autofécondation augmente fortement dans les phylogénies. La colonisation de nouveaux écosystèmes pourrait également amener à cette rupture. Les événements de dispersion longue distance sont un cas particulier de cette colonisation, mais représentent un cas fréquent de rupture de l'interaction avec les pollinisateurs, comme cela a été le cas pour la vanille (*Vanilla planifolia*) présentée au début de cette thèse.

La connaissance des facteurs intrinsèques (traits) ou extrinsèques (écologie) conduisant à l'évolution de l'autofécondation peut avoir des intérêts fondamentaux dans la compréhension de la diversité d'angiospermes actuelle, mais également dans l'identification et la protection d'espèces qui pourraient être particulièrement vulnérables à une évolution vers ce potentiel cul-de-sac dans les contextes actuels de déclin des pollinisateurs et de changements globaux.

*In the name of the Bee –
And of the Butterfly –
And of the Breeze – Amen!*

Emily Dickinson

Bibliographie

- T.-L. Ashman et C. J. Majetic (2006). Genetic constraints on floral evolution: a review and evaluation of patterns. *Heredity*, 96(5):343–352. doi: 10.1038/sj.hdy.6800815.
- S. C. H. Barrett (2010). Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1537):99–109. doi: 10.1098/rstb.2009.0199.
- S. C. H. Barrett, L. D. Harder et A. C. Worley (1996). The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1345):1271–1280. doi: 10.1098/rstb.1996.0110.
- M. Baude, W. E. Kunin, N. D. Boatman, S. Conyers, N. Davies, M. A. K. Gillespie, R. D. Morton, S. M. Smart et J. Memmott (2016). Historical nectar assessment reveals the fall and rise of floral resources in Britain. *Nature*, 530(7588):85–88. doi: 10.1038/nature16532.
- S. Bauer, E. K. Tielens et B. Haest (2024). Monitoring aerial insect biodiversity: a radar perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 379(1904):20230113. doi: 10.1098/rstb.2023.0113.
- D. A. Bell, R. P. Kovach, Z. L. Robinson, A. R. Whiteley et T. E. Reed (2021). The ecological causes and consequences of hard and soft selection. *Ecology Letters*, 24(7):1505–1521. doi: 10.1111/ele.13754.
- G. Bell (2017). Evolutionary rescue. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48(1):605–627. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-110316-023011.
- J. C. Biesmeijer, S. P. M. Roberts, M. Reemer, R. Ohlemüller, M. Edwards, T. Peeters, A. P. Schaffers, S. G. Potts, R. Kleukers, C. D. Thomas, J. Settele et W. E. Kunin (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313(5785):351–354. doi: 10.1126/science.1127863.
- S. A. Bodbyl Roels et J. K. Kelly (2011). Rapid evolution caused by pollinator loss in *Mimulus guttatus*. *Evolution*, 65(9):2541–2552. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01326.x.
- H. Breuninger et M. Lenhard (2010). Control of tissue and organ growth in plants. In *Plant Development*, pages 185–220. Elsevier, New York, USA. doi: 10.1016/S0070-2153(10)91007-7.
- D. Charlesworth et B. Charlesworth (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1):237–268. doi: 10.1146/annurev.es.18.110187.001321.
- E. L. Charnov (1982). The theory of sex allocation. *Monographs in Population Biology*, 18:1–355.
- P. O. Cheptou (2019). Does the evolution of self-fertilization rescue populations or increase the risk of extinction? *Annals of Botany*, 123(2):337–345. doi: 10.1093/aob/mcy144.
- R. W. Cruden (1977). Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31(1):32. doi: 10.2307/2407542.
- I. Dajoz, I. Till-Bottraud et P.-H. Gouyon (1993). Pollen aperture polymorphism and gametophyte performance in *Viola diversifolia*. *Evolution*, 47(4):1080–1093. doi: 10.1111/j.1558-5646.1993.tb02137.x.
- T. G. Dobzhansky (1950). Evolution in the tropics. *American Scientist*, 38(2):208–221.
- L. Fishman et J. H. Willis (2008). Pollen limitation and natural selection on floral characters in the yellow monkeyflower, *Mimulus guttatus*. *New Phytologist*, 177(3):802–810. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02265.x.

- J. P. Foxe, T. Slotte, E. A. Stahl, B. Neuffer, H. Hurka et S. I. Wright (2009). Recent speciation associated with the evolution of selfing in *Capsella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13): 5241–5245. doi: 10.1073/pnas.0807679106.
- S. J. Franks, E. Hamann et A. E. Weis (2018). Using the resurrection approach to understand contemporary evolution in changing environments. *Evolutionary Applications*, 11(1):17–28. doi: 10.1111/eva.12528.
- E. Gagnon, R. Hilgenhof, A. Orejuela, A. McDonnell, G. Sablok, X. Aubriot, L. Giacomini, Y. Gouvêa, T. Bragionis, J. R. Stehmann, L. Bohs, S. Dodsworth, C. Martine, P. Poczai, S. Knapp et T. Särkinen (2022). Phylogenomic discordance suggests polytomies along the backbone of the large genus *Solanum*. *American Journal of Botany*, 109(4):580–601. doi: 10.1002/ajb2.1827.
- C. Galen (1989). Measuring pollinator-mediated selection on morphometric floral traits: bumblebees and the alpine sky plot *Polemonium viscosum*. *Evolution*, 43(4):882–890. doi: 10.1111/j.1558-5646.1989.tb05185.x.
- S. Glémin et J. Ronfort (2013). Adaptation and maladaptation in selfing and outcrossing species: new mutations versus standing variation. *Evolution*, 67(1):225–240. doi: 10.1111/j.1558-5646.2012.01778.x.
- S. Glémin, E. Bazin et D. Charlesworth (2006). Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1604): 3011–3019. doi: 10.1098/rspb.2006.3657.
- E. E. Goldberg, J. R. Kohn, R. Lande, K. A. Robertson, S. A. Smith et B. Igic (2010). Species selection maintains self-incompatibility. *Science*, 330(6003):493–495. doi: 10.1126/science.1194513.
- A. Gonzalez, O. Ronce, R. Ferrière et M. E. Hochberg (2013). Evolutionary rescue: an emerging focus at the intersection between ecology and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1610):20120404. doi: 10.1098/rstb.2012.0404.
- D. Goulson, E. Nicholls, C. Botías et E. L. Rotheray (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229):1255957. doi: 10.1126/science.1255957.
- R. Hilgenhof, E. Gagnon, S. Knapp, X. Aubriot, E. J. Tepe, L. Bohs, L. L. Giacomini, Y. F. Gouvêa, C. T. Martine, A. Orejuela, C. I. Orozco, I. E. Peralta et T. Särkinen (2023). Morphological trait evolution in *Solanum* (Solanaceae): evolutionary lability of key taxonomic characters. *Taxon*, 72(4):811–847. doi: 10.1002/tax.12990.
- B. Igic et J. W. Busch (2013). Is self-fertilization an evolutionary dead end? *New Phytologist*, 198(2): 386–397. doi: 10.1111/nph.12182.
- B. Igic et J. R. Kohn (2006). The distribution of plant mating systems: study bias against obligately outcrossing species. *Evolution*, 60(5):1098–1103. doi: 10.1111/j.0014-3820.2006.tb01186.x.
- B. Igic, L. Bohs et J. R. Kohn (2006). Ancient polymorphism reveals unidirectional breeding system shifts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5):1359–1363. doi: 10.1073/pnas.0506283103.
- W. M. Janousek, M. R. Douglas, S. Cannings, M. A. Clément, C. M. Delphia, J. G. Everett, R. G. Hatfield, D. A. Keinath, J. B. U. Koch, L. M. McCabe, J. M. Mola, J. E. Ogilvie, I. Rangwala, L. L. Richardson, A. T. Rohde, J. P. Strange, L. M. Tronstad et T. A. Graves (2023). Recent and future declines of a historically widespread pollinator linked to climate, land cover, and pesticides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(5):e2211223120. doi: 10.1073/pnas.2211223120.
- R. Lande et D. W. Schemske (1985). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution*, 39(1):24–40. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb04077.x.

- D. G. Lloyd (1965). Evolution of self-compatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University*, (195):3–134.
- D. G. Lloyd (1992). Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, 153(3):370–380.
- W. P. Maddison, P. E. Midford et S. P. Otto (2007). Estimating a binary character's effect on speciation and extinction. *Systematic Biology*, 56(5):701–710. doi: 10.1080/10635150701607033.
- G. Martin, C. Fontaine, F. Accatino et E. Porcher (2019). New indices for rapid assessment of pollination services based on crop yield data: France as a case study. *Ecological Indicators*, 101:355–363. doi: 10.1016/j.ecolind.2019.01.022.
- R. J. Mitchell, R. J. Flanagan, B. J. Brown, N. M. Waser et J. D. Karron (2009). New frontiers in competition for pollination. *Annals of Botany*, 103(9):1403–1413. doi: 10.1093/aob/mcp062.
- E. Noël, P. Jarne, S. Glémin, A. MacKenzie, A. Segard, V. Sarda et P. David (2017). Experimental evidence for the negative effects of self-fertilization on the adaptive potential of populations. *Current Biology*, 27(2):237–242. doi: 10.1016/j.cub.2016.11.015.
- S. G. Potts, J. C. Biesmeijer, C. Kremen, P. Neumann, O. Schweiger et W. E. Kunin (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6):345–353. doi: 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- G. H. Pyke (1991). What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature*, 350(6313):58–59. doi: 10.1038/350058a0.
- I. Quintero, M. J. Landis, W. Jetz et H. Morlon (2023). The build-up of the present-day tropical diversity of tetrapods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(20):e2220672120. doi: 10.1073/pnas.2220672120.
- A. Sicard et M. Lenhard (2011). The selfing syndrome: a model for studying the genetic and evolutionary basis of morphological adaptation in plants. *Annals of Botany*, 107(9):1433–1443. doi: 10.1093/aob/mcr023.
- A. Sicard, N. Stacey, K. Hermann, J. Dessoly, B. Neuffer, I. Bäurle et M. Lenhard (2011). Genetics, evolution, and adaptive significance of the selfing syndrome in the genus *Capsella*. *The Plant Cell*, 23(9):3156–3171. doi: 10.1105/tpc.111.088237.
- G. L. Stebbins (1957). Self fertilization and population variability in the higher plants. *The American Naturalist*, 91(861):337–354. doi: 10.1086/281999.
- N. Takebayashi et P. L. Morrell (2001). Is self-fertilization an evolutionary dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and a macroevolutionary approach. *American Journal of Botany*, 88(7):1143–1150. doi: 10.2307/3558325.
- C. Tang, C. Toomajian, S. Sherman-Broyles, V. Plagnol, Y.-L. Guo, T. T. Hu, R. M. Clark, J. B. Nasrallah, D. Weigel et M. Nordborg (2007). The evolution of selfing in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 317(5841):1070–1072. doi: 10.1126/science.1143153.
- M. Thomann, E. Imbert, C. Devaux et P.-O. Cheptou (2013). Flowering plants under global pollinator decline. *Trends in Plant Science*, 18(7):353–359. doi: 10.1016/j.tplants.2013.04.002.
- M. Thomann, E. Imbert, R. C. Engstrand et P.-O. Cheptou (2015). Contemporary evolution of plant reproductive strategies under global change is revealed by stored seeds. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(4):766–778. doi: 10.1111/jeb.12603.

- M. Vallejo-Marín et H. E. O'Brien (2007). Correlated evolution of self-incompatibility and clonal reproduction in *Solanum* (Solanaceae). *New Phytologist*, 173(2):415–421. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01924.x.
- B. Wallace (1975). Hard and soft selection revisited. *Evolution*, 29(3):465. doi: 10.2307/2407259.
- L. J. Weider, P. D. Jeyasingh et D. Frisch (2018). Evolutionary aspects of resurrection ecology: progress, scope, and applications-An overview. *Evolutionary Applications*, 11(1):3–10. doi: 10.1111/eva.12563.
- A. Weinbach, N. Loeuille et R. P. Rohr (2022). Eco-evolutionary dynamics further weakens mutualistic interaction and coexistence under population decline. *Evolutionary Ecology*, 36(3):373–387. doi: 10.1007/s10682-022-10176-7.
- A. A. Winn, E. Elle, S. Kalisz, P.-O. Cheptou, C. G. Eckert, C. Goodwillie, M. O. Johnston, D. A. Moeller, R. H. Ree, R. D. Sargent et M. Vallejo-Marín (2011). Analysis of inbreeding depression in mixed-mating plants provides evidence for selective interference and stable mixed mating. *Evolution*, 65(12): 3339–3359. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01462.x.



Digression

Ma découverte du monde des médias, la pensée et le bourdon

Suite à la publication de mon article de thèse, j'ai eu la chance de découvrir comment se faisait la communication scientifique par voie de presse et d'être sollicité par plusieurs médias. Cela m'a occupé entre deux et trois mois durant cette thèse, aussi il me paraissait intéressant de partager cette expérience et les quelques réflexions qu'elle a suscitées chez moi. Les premiers résultats de cette thèse ont été disponibles à la fin du mois de juin 2021. De suite, Pierre-Olivier a flashé (*sic*) sur les résultats montrant la diminution de la taille de fleur et de la quantité de nectar. Pour ma part, les résultats étaient cohérents avec les attendus théoriques et remarquablement clairs avec nos quatre populations montrant la même tendance, fait assez rare en population naturelle pour être noté. Mais cela ne m'emballait pas plus que cela, probablement à cause de mon manque de recul sur la littérature et sur ce que sont des beaux (*sic*) résultats. Mon biais de biologiste touche-à-tout et mes souvenirs de mon sujet d'oral d'entrée à l'École normale supérieure, « la fleur », me faisaient surtout flasher sur le fait que, bien qu'ils partagent de nombreux gènes pour leur développement, les pétales évoluaient mais pas du tout les sépales. Fait beaucoup moins intéressant pour les personnes à qui j'en parlais. Malgré les péripéties liées à la tentative de publication dans des revues à fort impact, dont les intérêts pour la Science et le mode de fonctionnement pourraient mériter discussion, qui avaient tendance à me faire remettre en cause la qualité de notre travail, Pierre-Olivier restait convaincu que ces résultats avaient une certaine portée en dehors du petit monde académique et, lorsque ce travail fut en bonne voie pour être publié, il m'a encouragé à essayer de communiquer à son sujet.

Bien que lisant régulièrement la presse, et notamment les articles parlant de science, le fonctionnement de la communication scientifique par voie de presse m'était alors totalement inconnu. Je comprenais assez mal pourquoi tel sujet était traité dans les journaux plutôt qu'un autre. C'est Ana Rodrigues, chercheuse au CEFÉ, qui m'a fait découvrir ce monde, car c'est tout un monde. L'actualité scientifique est généralement traitée par les médias sous le mode de l'instantané, du direct. Tout doit se faire en amont de la publication de l'article scientifique pour que la communication l'entourant soit simultanée à sa publication. Après, c'est trop tard. La première chose est donc de savoir si le journal scientifique dans lequel l'article est publié possède son propre service presse, ce qui est relativement rare. Auquel cas, le journal peut choisir les articles sur lesquels il souhaite communiquer, puis construire et diffuser un communiqué de presse à destination des médias avant la publication officielle. Sinon, et c'est généralement comme cela que cela se passe, le choix d'essayer de faire de la communication est à la discrétion des auteurs et autrices qui contactent soit des journalistes directement, soit les services presse de leurs organismes de recherche, à savoir le CNRS et l'Université de Montpellier dans notre cas.

Une fois que le choix de communiquer sur l'étude a été fait, il est préférable de se donner toutes les chances pour que cela fonctionne. Le sujet et les résultats jouent beaucoup. Notre article parlant de l'effet du déclin des pollinisateurs sur les plantes et pointant un risque de rupture de l'interaction entre les plantes et leurs pollinisateurs, il s'inscrivait parfaitement dans les questions de crise de la biodiversité et des récents arbitrages sur l'utilisation de pesticides. Il était de ce fait, comme l'avait vu Pierre-Olivier, probablement intéressant d'un point de vue sociétal. Cependant, cela ne suffit pas. Le

temps disponible pour traiter une actualité est extrêmement limité et les journalistes ne sont pas, et ne peuvent pas être, expertes et experts de tous les sujets traités. Il est très probable que l'article scientifique ne soit pas lu. Aussi, la construction du communiqué de presse est fondamentale. Le meilleur moyen pour que celui-ci soit bien reçu et relayé est qu'il ressemble déjà à un article de presse, incluant un titre accrocheur, des chiffres marquants et des citations des auteurs et autrices de l'étude. Être à l'origine de la production de l'article offre la possibilité de maîtriser les conclusions données à l'étude et l'utilisation de sa parole. Ana a été extrêmement précieuse pour cette étape et je la remercie encore pour la patience et l'aide qu'elle m'a accordées.

Les services de presse du CNRS n'ont, quant à eux hélas, pas été d'une grande aide dans ce déroulé et ont même été quelques fois contre-productifs. Nous avons besoin d'eux pour utiliser leur carnet d'adresses afin de transmettre le communiqué de presse largement. Cependant il a fallu les bombarder de courriels et d'appels téléphoniques pour qu'une commission valide la recevabilité de l'étude. Puis, malgré notre travail en amont, la co-construction d'un communiqué de presse a été laborieuse et a impliqué de nombreuses batailles pour éviter que le message de l'étude ne soit déformé. Le temps pressant, il a fallu que je retarde la date de publication de l'étude. Tout cela a été la source d'une surcharge de travail hautement chronophage. Je n'oublie pas également la demande tardive d'avoir l'exclusivité de la communication et donc la nécessité que nous demandions aux services de presse de l'Université de Montpellier, proposant une diffusion plus restreinte, de se retirer après avoir travaillé efficacement avec eux.

Une fois toutes ces étapes passées, si le communiqué intéresse, viennent alors les sollicitations par les médias. Le temps pressant, le contact se fait souvent directement par téléphone, sans prise de contact préalable. Cela demande une disponibilité totale mais également un discours relativement rodé afin de rester focalisé sur l'étude. En effet, les appels sont généralement enregistrés pour intégrer des citations et généralement aucun regard n'est donné sur ce qui sera fait de cette parole.

La communication autour de cet article a plutôt été une réussite au vu du nombre de médias ayant traité l'information mais également de la manière dont l'information a été traitée. Il était important pour moi d'amener dans le débat que la crise de la biodiversité, dont nous sommes responsables, ne se résume pas à un nombre d'individus qui diminue, dynamiques qu'on peut penser facilement réversibles. Cette crise implique des trajectoires évolutives, potentiellement irréversibles et délétères, qui peuvent profondément modifier le devenir de l'arbre du vivant. C'est, en plus des extinctions que nous verrons, potentiellement l'amorçage d'une réelle bombe à retardement pour la biodiversité, qui nous dépasse largement. Souhaitons-nous laisser la trace de nos choix de société sur le devenir d'une large partie de l'arbre du vivant ?

Malgré sa relative réussite, cette expérience a aussi été source de malaises et de questionnements pour moi. La première surprise a été de découvrir que cela revient aux autrices et auteurs de l'étude de déterminer l'intérêt, ou non, de leur recherche pour la société. Certaines personnes sont plus enclines à considérer leur recherche intéressante pour la société, ou pire, selon moi, à chercher la notoriété. Cela laisse la place à des biais de représentation parmi les autrices et auteurs des travaux étant communiqués et parfois même entre les personnes citées parmi les collaborateurs et collaboratrices d'un même travail. Sur ce point, je remercie Pierre-Olivier d'avoir fait en sorte que nous soyons tous les deux identifiés dans la réalisation de ce travail, ce qui n'est pas toujours simple lorsqu'on n'est pas étiqueté chercheur confirmé. Cette communication au bon vouloir des auteurs et autrices laisse potentiellement sous silence

des études qui pourraient avoir des intérêts sociétaux importants, parce que les personnes n'osent pas ou ne veulent pas communiquer dessus. Dans une période où la science se revendique de plus en plus au service de la société, tout en étant pourtant fortement remise en question par la société elle-même, cela me paraît être un frein au partage du savoir scientifique.

La deuxième interrogation vient du fonctionnement de l'accès à la diffusion. Pour réussir à passer les différents filtres, il faut les connaître et savoir passer au travers. Or, aucune formation à ce sujet ne m'avait été dispensée avant d'en discuter avec Ana. Même des chercheurs et chercheuses en poste depuis de nombreuses années, comme Pierre-Olivier, sont étrangers et étrangères à ce fonctionnement. Il y a donc les personnes initiées, qui savent comment cela fonctionne et ont même potentiellement déjà leur carnet d'adresses personnel, et les autres. Cela peut encore une fois être la source d'une représentation biaisée des travaux de recherche. Je suis surpris de l'efficacité relative du service de presse du CNRS qui ne semble pas permettre de pallier ce problème. Outre les déboires pour réussir à les contacter, le choix de faire un communiqué de presse réduit à la portion congrue diminue probablement la chance que celui-ci soit relayé tout en augmentant le temps alloué par les autrices et auteurs de l'étude aux réponses aux sollicitations. En effet, bien souvent, le simple fait d'envoyer notre propre communiqué, plus complet, suffisait à satisfaire les besoins des personnes nous contactant.

Enfin, j'ai été très surpris que l'actualité scientifique soit soumise à la même immédiateté que les faits divers. Bien que la recherche scientifique puisse être mise sous pression avec une demande de résultats rapides, pression accentuée par l'avènement du financement par projet, la connaissance scientifique se construit sur le long terme. Cette thèse s'appuie sur des décennies de recherches et d'études préalables et près de trois années se sont écoulées entre mon stage de deuxième année de master où j'ai fait pousser les premières pensées et la publication de cet article scientifique. La communication associée devrait, elle, se faire dans les 24h suivant la publication.

Il existe d'autres manières de partager notre recherche, *via* des rencontres ou conférences grand public ou encore le transfert direct par les réseaux sociaux, cependant les médias restent une ressource importante pour transmettre le fruit de notre travail au plus grand nombre. Aussi, il me paraît important, au sein de la communauté scientifique, de réfléchir sur le mode de fonctionnement actuel et de discuter de nos aspirations. Pour ma part, en premier lieu, il est nécessaire que les chercheuses et chercheurs ne soient pas nécessairement à l'initiation de la communication de leurs propres études. La recherche se base régulièrement sur l'évaluation du travail par les pairs et il serait intéressant que les études choisies pour être diffusées le soient par des pairs, compétents dans le domaine mais indépendants de l'étude en question. Les comités éditoriaux des journaux scientifiques semblent être un lieu adéquat pour choisir les études à mettre en avant. Les instituts de recherche pourraient également s'appuyer sur leurs services de communication pour constituer des comités examinant les nouvelles études de l'institut et choisissant celles sur lesquelles mettre l'accent.

Deuxièmement, les chercheurs et chercheuses ne devraient pas nécessairement être responsables de la réalisation de leur propre communication. La capacité de partage d'informations au plus grand nombre est, selon moi, une compétence différente de celles nécessaires pour la recherche. Certaines personnes peuvent la posséder en plus de leurs compétences de recherche mais il me paraît anormal que les études relayées relèvent plus de la capacité de ses auteurs et autrices à la transmettre que de l'importance sociétale de l'étude.

Enfin, je pense qu'il est important que la transmission du savoir scientifique par les médias relève

davantage du dossier que de la brève. Cela demande de repenser l'approche de l'information scientifique avec la nécessité d'un travail d'investigation pour s'appropriier le sujet et les résultats pour ensuite les rendre accessibles. Ce travail, déjà fait par certains médias, demande du temps et implique de décorrélérer l'information scientifique de l'immédiat. La récente crise sanitaire a montré à quel point la diffusion d'informations erronées mais prétendument scientifiques peut être rapide et massive. Peut-être est-il donc temps d'exiger une prise de recul et un ralentissement nécessaire au partage de connaissances permettant ensuite de se constituer une opinion. Le travail scientifique est une pensée qui met du temps pour croître puis s'épanouir, alors que les médias ressemblent trop souvent à un bourdon pataud qui butine au plus vite, sans s'inquiéter du bon transfert de pollen. Peut-être est-il temps que la pensée fasse en sorte que les visites par le bourdon soient précises et efficaces.



Résumé

À la faveur d'une promenade printanière au cœur de la nature, il n'est pas rare de profiter du spectacle qu'offre la floraison. Les formes et les couleurs des fleurs viennent capturer le regard. Ces appareils jouent un rôle fondamental dans la reproduction. La fleur est le siège de la reproduction sexuée pour les plantes qui en possèdent. Elle porte à la fois des pièces florales fertiles, généralement mâles et femelles, et des pièces florales stériles comme les pétales. Le rôle de ces pièces florales stériles est d'aider à la rencontre des gamètes, la pollinisation. La large majorité des plantes à fleurs sont pollinisées par des insectes, aussi, au spectacle des formes et des couleurs se superpose un ballet papillonnant, et bourdonnant. Or, ces pollinisateurs sont actuellement menacés par les activités humaines. Cette thèse s'appuie sur l'hypothèse que, en plus de rendre nos printemps silencieux, le déclin actuel des pollinisateurs impacte le système de reproduction des plantes à fleurs. En l'absence de pollinisateurs, la reproduction avec soi-même, l'autofécondation, est une solution pour maintenir une descendance. Cette thèse rend compte de l'évolution récente du système de reproduction d'une plante à fleurs, la pensée des champs (*Viola arvensis*), et notamment de ses traits floraux, pour ensuite comprendre si le déclin des pollinisateurs peut en être à l'origine.

Pour mesurer l'évolution d'une population, il est nécessaire d'avoir au moins deux points de comparaison espacés dans le temps. L'écologie de la résurrection permet d'accéder aux traits de populations passées sans nécessiter qu'ils aient été eux-mêmes mesurés dans le passé. En effet, cette méthode permet de comparer des individus issus de populations ancestrales, conservés grâce à leur dormance, à des individus actuels descendants de cette population ancestrale. La structure génétique et les traits des populations ancestrales sont capturés et conservés par les individus en dormance et peuvent aisément être révélés en levant cette dormance. Il est alors possible de faire pousser côte-à-côte, dans le même environnement, ancêtres et descendants, ce qui permet de caractériser l'évolution entre les deux. Cette méthode a été utilisée sur quatre populations de pensée des champs échantillonnées dans le Bassin parisien, une première fois dans les années 1990-2000, puis une seconde fois en 2021.

En alliant mesures de la structure génétique des populations, mesures phénotypiques et expériences de choix par des pollinisateurs, cette thèse montre que les quatre populations actuelles de pensée des champs se reproduisent avec des taux d'autofécondation plus élevés, produisent des fleurs aux pétales plus petits, produisent moins de nectar, et sont finalement moins attractives que leurs ancêtres. Le fait que ces changements ne soient pas juste liés à l'augmentation de la consanguinité associée à l'autofécondation est confirmé par des mesures de dépression de consanguinité très faibles. L'ensemble des traits ayant évolué forment ce qui est appelé un syndrome d'autofécondation, commun chez les espèces très autogames. L'importance de ces traits dans la réalisation de l'autofécondation a été quantifiée pour les voies mâle et femelle. Les traits modulant l'autofécondation *via* l'interaction avec les pollinisateurs sont ceux qui ont évolué. Enfin, l'absence d'évolution des traits étant indépendants des pollinisateurs malgré leur héritabilité élevée, comme la longueur du sépale, renforce l'hypothèse que le déclin des pollinisateurs est à l'origine de l'évolution observée.

En plus de le rendre silencieux, le déclin des pollinisateurs menacerait donc aussi les formes et les couleurs de nos printemps avec le développement du syndrome d'autofécondation. Ce syndrome tend à rompre les interactions avec les pollinisateurs et pourrait avoir un effet d'emballement sur leur déclin. Cette évolution menacerait alors l'ensemble de la chaîne trophique.

Summary

On a springtime walk, it is not uncommon to enjoy the spectacle of flowers in bloom. The shapes and colors of the flowers capture the gaze. These features play a fundamental role in reproduction. The flower is where sexual reproduction occurs in flowering plants. It carries both fertile floral parts, generally male and female, and sterile floral parts such as petals. The role of these sterile floral parts is to help the gametes encounter, the pollination. The vast majority of flowering plants are pollinated by insects, so the spectacle of shapes and colors is superimposed on a buzzing ballet. Yet, these pollinators are currently threatened by human activity. This thesis is based on the assumption that, in addition to rendering our springs silent, the current pollinator declines impacts the reproductive system of flowering plants. In the absence of pollinators, reproduction with oneself – self-fertilization or selfing – is a solution to produce offspring. This thesis reports on the recent evolution of the reproductive system of a flowering plant, the field pansy (*Viola arvensis*), and in particular its floral traits, in order to understand whether the pollinator declines may be the cause.

To analyze the evolution of a population, at least two points of comparison spaced over time are necessary. Resurrection ecology provides access to the traits of past populations without the need for them to have been measured in the past. Indeed, this method compares individuals from ancestral populations, preserved thanks to their dormancy, with current individuals descended from this ancestral population. The genetic structure and traits of the ancestral populations are captured and preserved by dormancy, and can easily be revealed by breaking it. It is then possible to grow ancestors and descendants side-by-side, in the same environment, making it possible to characterize the evolution between the two. This method has been used on four populations of field pansy sampled in the Paris Basin, first in 90s-2000s, then a second time in 2021.

By combining measurements of population genetic structure, phenotypic measurements and pollinator behavior experiments, this thesis shows that the four current populations of field pansy reproduce with higher selfing rates, produce flowers with smaller petals, produce less nectar, and are ultimately less attractive to pollinators than their ancestors. The fact that these changes are not just linked to increased inbreeding associated to selfing is confirmed by very low measures of inbreeding depression. Together, these evolved traits form what is known as a selfing syndrome, common in highly selfing species. The importance of these traits for selfing has been quantified for both the male and female pathways. Traits modulating selfing *via* interaction with pollinators are those that have evolved. Finally, the absence of evolution in traits that are independent of pollinators despite their high heritability, such as sepal length, reinforces the hypothesis that pollinator declines are at the origin of the observed evolution.

As well as making it silent, the pollinator declines could also threaten the shapes and colors of our springs, with the development of the selfing syndrome. This syndrome tends to disrupt interactions with pollinators which could have a runaway effect on their declines. Therefore, this evolution could threaten the entire trophic chain.