



HAL
open science

Interactions plantes-pollinisateurs et reproduction sexuée en habitat fragmenté. Le cas d'un arbuste à floraison massive

Chloé E. L. Delmas

► **To cite this version:**

Chloé E. L. Delmas. Interactions plantes-pollinisateurs et reproduction sexuée en habitat fragmenté. Le cas d'un arbuste à floraison massive. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2012. Français. NNT: . tel-02810733

HAL Id: tel-02810733

<https://hal.inrae.fr/tel-02810733>

Submitted on 6 Jun 2020

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité : Écologie, Biodiversité et Évolution

Présentée et soutenue par *Chloé Delmas*

Le 16 janvier 2012

Interactions plantes-pollinisateurs et
reproduction sexuée en habitat fragmenté

Le cas d'un arbuste à floraison massive

École doctorale :

Sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries (SEVAB)

Unité de Recherche :

Laboratoire EDB (Évolution et Diversité Biologique)

Directeurs de Thèse :

Dr. Nathalie Escaravage & Dr. André Pornon

Membres du jury :

Mme	Emmanuelle Porcher (MCF Muséum Paris)	Rapporteur
M.	Finn Kjellberg (DR CNRS Montpellier)	Rapporteur
Mme	Anne-Laure Jacquemart (Pr. UC Louvain Belgique)	Examineur
M.	Bertrand Schatz (CR CNRS Montpellier)	Examineur
M.	Jean-Baptiste Ferdy (Pr. UT3 Paul Sabatier)	Président du jury
M.	André Pornon (MCF UT3 Paul Sabatier)	Directeur de thèse
M.	Pierre-Olivier Cheptou (CR CNRS Montpellier)	Membre invité

À mon père

Avant propos

Cette thèse en Écologie, biodiversité et évolution de l'École doctorale des Sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries (SEVAB) de l'Université Toulouse III, d'une durée de trois ans, a été financée par une bourse de recherche ministérielle. Ces recherches ont également été en partie financées par un projet de la Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB), COMBIO N° AAP-IN-2009-013. Ce travail s'est déroulé au sein du laboratoire Évolution et Diversité biologique (UMR 5174 CNRS-UPS). Le manuscrit est composé de trois parties : (i) une introduction générale, (ii) cinq articles scientifiques et (iii) une discussion générale faisant le lien entre les différents résultats obtenus.

Remerciements

Mes premiers remerciements vont tout naturellement vers mes directeurs de thèse, André Pornon et Nathalie Escaravage, qui m'ont fait partager leur passion pour le Rhododendron ferrugineux. Je vous remercie pour cette belle découverte, pour m'avoir accueillie si chaleureusement au sein de l'équipe et pour avoir été d'une disponibilité sans faille. Merci Nathalie pour m'avoir transmis ton savoir dans l'art des pollinisations, des émasculations, des (interminables) comptages de pollen, de graines ou autres choses microscopiques, pour m'avoir initiée à la biologie moléculaire et pour avoir partagé pendant 3 ans ton bureau avec moi dans lequel il a toujours fait bon vivre. André, je te suis très reconnaissante pour la confiance et la liberté que tu m'as accordées tout au long de cette thèse, que ce soit dans la réalisation des manips ou dans la rédaction, et qui m'ont permis de me construire scientifiquement. Merci pour toutes nos discussions sur ce sujet de thèse qui m'a réellement passionné.

Une étape importante de ma thèse a été l'immersion à Camurac, et je dois énormément à tous les stagiaires qui m'ont aidé dans la collecte des données. Un immense merci donc à Laurent, Maxime et Pierre qui ont inauguré avec moi la piste du Coste rouge en 2009 ! Merci à tous les trois pour votre motivation et votre bonne humeur quelque soit la quantité de brouillard. Ce premier terrain restera un moment fort de ma thèse. En 2010, j'ai eu la chance de rencontrer Vivien, Rémy et Thomas : merci pour votre aide et pour tous les bons moments rythmés par les découvertes musicales ! Un grand merci (encore) à Nathalie et André pour n'avoir jamais raté une occasion d'aller sur le terrain avec nous !

Je remercie vivement les entomologistes qui ont identifié les insectes collectés au cours de ma thèse : Pierre Rasmont (qui m'a permis de découvrir la vallée d'Eyne, m'a conseillé sur les méthodes de captures des bourdons et sur l'utilisation des données GPS et qui a pris le temps de m'initier à l'identification des bourdons), Alain Pauly, Christophe Dageron, Jean-Pierre Sarthou et Laurent Pelozuelo pour ses conseils sur la conservation des diptères.

De retour au labo, de nombreuses personnes m'ont conseillé lors de mes débuts à la paillasse et dans l'analyse de mes données génétiques, une aide précieuse sans laquelle je n'aurais pu mener à bien mon projet ! Mille mercis à mes très chères Aurélie, Juliette, Céline et Sophie, toujours là pour répondre à mes interrogations ; Merci au Dr. Pierre-Jean, à Emeline (ma partenaire de soirées au 4R3), Joris, Fred, Sophie R. et Fred M. de la Génopole et merci à Clervie et Olivia qui m'ont aidé à réaliser les extractions. Je remercie également Thibault Malausa pour m'avoir permis de participer au projet Ecomicro qui a fait avancer d'un grand bon mon projet de thèse.

Une expérience très enrichissante a été le co-encadrement d'un stagiaire de M1, et quel stagiaire !! J'ai eu le plaisir de travailler avec Thomas Fort, toujours de bonne humeur même au fil des heures de microscope.

Plusieurs personnes ont eu la gentillesse de discuter avec moi de mes résultats, de mes statistiques ou de relire des manuscrits. Merci à Christophe Andalo, Jean-Baptiste Ferdy, Bertrand Schatz et Elizabeth Elle pour leurs précieux conseils.

Je remercie plus particulièrement Pierre-Olivier Cheptou pour les différentes discussions que l'on a eu au cours de ma thèse, toujours passionnantes, et pour m'avoir accueillie quelques jours à Montpellier qui m'ont permis de me lancer dans cette thématique fascinante qu'est l'évolution des systèmes de reproduction !

Je tiens à remercier vivement les membres de mes deux comités de thèse qui, chacun dans leur thématique, m'ont tous donné de nombreux conseils sur les orientations de ma thèse: Christophe Andalo, Pierre-Olivier Cheptou, Myriam Gaudeul, Bertrand Schatz et Pierre Rasmont.

Je souhaite également sincèrement remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de lire et de juger ce travail : Emmanuelle Porcher, Anne-Laure Jacquemart, Finn Kjellberg, Bertrand Schatz et Jean-Baptiste Ferdy. De nouveau, merci à Pierre-Olivier Cheptou pour avoir accepté de participer à ma soutenance.

Dans un autre registre, la vie quotidienne à EDB n'aurait pas été si agréable sans la présence de toutes les personnes qui participent à la création d'une ambiance chaleureuse !

J'ai eu la chance de rencontrer des personnes formidables en arrivant au labo...un immense merci à Aurélie et Juliette pour être vous et pour avoir été là pour moi, dans les hauts et dans les bas inhérents à la thèse ! Juju, une pensée bien particulière pour toi au moment où j'écris ces remerciements...je te souhaite plein de bonheur. Auré, depuis notre rencontre dans ton bureau de M2 la veille du concours... jusqu'au 4R1, on aura tout partagé ! et ce fût un vrai bonheur !

Comment ne pas remercier Céline et Sophie, Peggy et plus récemment Amaia pour tous les bons moments passés ensemble... merci pour tout !

La vie de thésard n'aurait pas été la même sans Joss, PJ, Joris, Pascal, Boris, Léa, Pauline, Thomas, Emeline, Maxime, Staffan, Yann, Juliane, Victor, Marion, Gabriel, Benoit, Guillaume, Monique B., Sergine, Emilie, Maily, Erwan, Elodie, Claire, Sarah, et Olivia à qui j'ai légué le compteur et la bino ! Plein de bonnes choses pour ta thèse et pour tous tes projets !

Enfin, je tiens à remercier profondément toute ma famille et mes amis pour leur soutien et leurs encouragements, forces de ma motivation ! A maman pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix d'orientations et pour être toujours là pour moi. A Eve pour ton intérêt pour mon sujet de thèse que tu connais maintenant par cœur pour l'avoir patiemment édité ! Une pensée pour le petit Cassien dont j'ai appris la naissance au beau milieu du patch M1P2 au 3^e jour de terrain... Mes potes de toujours Lia, Marie et Ingrid ont été présentes du début à la fin malgré mon manque de disponibilité...merci pour votre soutien. Enfin, merci à mon ange et à sa famille pour m'avoir soutenue tout au long de ma thèse.

SOMMAIRE GÉNÉRAL

<i>Préambule</i>	7
INTRODUCTION GÉNÉRALE	9
CHAPITRE 1. Effects of patch floral display and isolation on community visitor assemblage and pollen transfer limitation in <i>Rhododendron ferrugineum</i> (Ericaceae)	49
CHAPITRE 2. Effects of mate versus pollinator availabilities on pollen transfer and limitation in a mass-flowering species	73
CHAPITRE 3. Isolation and characterization of microsatellite loci in <i>Rhododendron ferrugineum</i> (Ericaceae) using pyrosequencing technology	97
CHAPITRE 4. Mating system in mass-flowering plants: inferring the joint effects of pollinators, floral traits and floral resources in the species <i>Rhododendron</i>	103
CHAPITRE 5. The non-adaptive value of selfing in fragmented plant patches: the case of a mass-flowering shrub	127
DISCUSSION GENERALE	149
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	185
ANNEXES	201
1. A mass-flowering species shapes the phylogenetic structure of its surrounding community	203
2. Liste des insectes présents dans les landes à <i>R. ferrugineum</i>	213
3. Liste des méthodes utilisées et des variables estimées au cours de la thèse	219

PRÉAMBULE — POLLINISATION ET BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

La biologie de la reproduction et de la pollinisation des plantes fascine depuis plus de deux siècles une large communauté de scientifiques. Joseph Gottlieb Kölreuter (1761-1766) et plus particulièrement Christian Konrad Sprengel (*The Secret of Nature in the Form and Fertilization of Flowers Discovered*, 1793) furent les premiers à étudier les mécanismes de pollinisation et de fécondation chez les plantes. Sur la base de nombreuses observations, Sprengel conclut que les fleurs possèdent des traits spécifiques favorisant l'attraction des insectes pollinisateurs. Ces résultats furent repris par Charles Darwin qui publia au XIX^e siècle ses théories sur les adaptations florales favorisant la fécondation croisée (1862), les conséquences de l'autofécondation (1876) et le polymorphisme des formes florales (1877). Les travaux de Darwin sur la biologie de la reproduction ont été un point de départ crucial pour de nombreuses études sur les interactions plantes-pollinisateurs ainsi que sur les systèmes de reproduction, et restent encore aujourd'hui une référence capitale (Pannell, 2009).

De nouvelles méthodes se sont développées au cours du XX^e siècle conduisant à la séparation de deux disciplines : la biologie de la pollinisation et la génétique (des populations et quantitative)¹. La pollinisation, responsable de la dissémination du pollen, est un processus fondamental pour la reproduction sexuée des plantes. Les études sur la pollinisation se sont longtemps concentrées sur les interactions biologiques, délaissant cependant le rôle de ces dernières dans les systèmes de reproduction et la valeur sélective des plantes. De même, les études sur les systèmes de reproduction se sont intéressées à la transmission des gènes entre générations de façon expérimentale et théorique sans considérer les facteurs écologiques biotiques et abiotiques gouvernant la dispersion du pollen et les événements de reproduction (Barrett & Harder, 1996). Malgré le lien fonctionnel évident entre la pollinisation et les systèmes de reproduction, ce n'est que depuis la fin du dernier millénaire que ces deux disciplines ont été abordées de concert (Barrett *et al.*, 1992).

Ce travail de thèse suit cette trajectoire, en étudiant, à l'aide d'une approche pluridisciplinaire, le rôle des interactions plantes-pollinisateurs de la communauté dans la pollinisation et le système de reproduction d'une plante cible.

¹ Les seules exceptions restent les travaux de Stebbins (1970, 1974) et de Grant (1949) qui recouvrent la génétique, l'écologie et la systématique des plantes.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

SOMMAIRE – INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. INTRODUCTION	- 13 -
2. LA POLLINISATION, FACTEUR LIMITANT DE LA REPRODUCTION SEXUÉE.....	- 16 -
2.1. LA LIMITATION DE LA POLLINISATION : DÉFINITION ET MÉCANISMES IMPLIQUÉS.....	- 16 -
2.2. LA LIMITATION EN POLLINISATEURS	- 19 -
2.2.1 <i>Déclin des pollinisateurs</i>	- 19 -
2.2.2 <i>Tricherie</i>	- 20 -
2.2.3 <i>Faible attractivité des populations et effet Allee</i>	- 21 -
2.2.4 <i>Compétition intraspécifique</i>	- 21 -
2.2.5 <i>À l'échelle de la communauté: compétition interspécifique</i>	- 22 -
2.3 LA LIMITATION EN PARTENAIRES POUR LA REPRODUCTION	- 24 -
2.4 LIMITATION EN POLLINISATEURS ET LIMITATION EN PARTENAIRES POUR LA REPRODUCTION : QUELLES EN SONT LES CONSÉQUENCES ET COMMENT LES DISTINGUER ?.....	- 25 -
3. QUELS MÉCANISMES PEUVENT COMPENSER LA LIMITATION DE LA POLLINISATION ?	- 28 -
3.1 ASSURANCE DE LA REPRODUCTION ET ÉVOLUTION DE L'AUTOFÉCONDATION	- 28 -
3.2 FORCES SÉLECTIVES ET SYSTÈME DE REPRODUCTION DANS UN CONTEXTE DE LIMITATION DE LA POLLINISATION	- 32 -
3.3 INTERACTIONS POSITIVES ENTRE ESPÈCES.....	- 37 -
4. OBJECTIFS DE LA THÈSE	- 38 -
5. CADRE DE L'ÉTUDE	- 40 -
5.1 LES LANDES À RHODODENDRON	- 40 -
5.2 SITE D'ÉTUDE.....	- 43 -
5.2.1 <i>Au pays de Sault</i>	- 43 -
5.2.2 <i>Le gradient de structuration spatiale étudié</i>	- 44 -
5.2.3 <i>Étude des caractéristiques de la communauté environnante</i>	- 47 -

1. INTRODUCTION

En raison de l'immobilité des plantes, leur reproduction sexuée est dépendante d'un vecteur de pollen biotique ou abiotique transportant les gamètes mâles entre les individus. Chez les plantes entomogames, le degré de dépendance vis-à-vis des insectes mutualistes pour leur reproduction peut être très variable entre espèces ou entre populations d'une même espèce (Richards, 1986; Barrett, 2010a), allant du mutualisme obligatoire au mutualisme facultatif². Parmi les angiospermes, 70 % des espèces possèdent des fleurs hermaphrodites (présence d'organes fonctionnels mâles et femelles au sein d'une même fleur ; Richards, 1986) qui ont la capacité de produire des graines par autofécondation (fusion d'un gamète mâle avec un gamète femelle du même individu génétique) et par allofécondation (fusion de gamètes d'individus génétiquement différents). Dans le cas d'espèces hermaphrodites autocompatibles, l'autofécondation peut se produire au sein d'une fleur ou au sein d'un même individu (geitonogamie), processus particulièrement courant lorsque les espèces ont une floraison massive (de Jong *et al.*, 1993; Snow *et al.*, 1996). Une plante auto-incompatible se reproduit nécessairement par allofécondation, mais chez les plantes autocompatibles, le taux d'autofécondation (ou d'allofécondation) varie de 0 à 100 % et 42 % des espèces ont un système de reproduction mixte (20 % à 80 % des graines issues d'autofécondation ; Goodwillie *et al.*, 2005).

Le système de reproduction réalisé (taux d'autofécondation ou d'allofécondation) dépend de la quantité relative d'auto et d'allopollen reçue par la plante, qui est considérablement influencée par les caractéristiques de l'espèce considérée, de la communauté de plantes et des pollinisateurs (Geber & Moeller, 2006). Par exemple, les patrons de dispersion du pollen sont influencés par la taille, la densité et l'isolement des populations de plantes ainsi que par la présence d'espèces cofleurissantes. Tous ces facteurs conditionnent la composition de l'assemblage de pollinisateurs, leur comportement, la composition de leurs charges polliniques lors de leurs déplacements au sein du même individu, entre individus de la même espèce ou d'espèces différentes. La compréhension du système de reproduction et de ses variations ne peut donc se faire qu'à la lumière des interactions plantes-pollinisateurs à l'échelle de la communauté. De plus, des filtres sélectifs pré ou postzygotiques permettent, une fois le pollen déposé, d'éviter ou de limiter la fécondation par du pollen non compatible

² Le mutualisme est « facultatif » lorsque les plantes ont la capacité de réaliser leur reproduction sexuée sans l'intervention d'un pollinisateur, par exemple : par autofécondation spontanée ou cléistogamie.

(Jones, 1928; Casper, 1988; Becerra & Lloyd, 1992). Par conséquent, le système de reproduction réalisé n'est pas un simple reflet de la dispersion du pollen (Waser, 1978; Campbell, 1991).

Du fait de la dépendance évolutive entre les insectes et les plantes mutualistes, la reproduction des plantes à fleurs est sensible aux variations biotiques et abiotiques (Bond, 1994; Renner, 1998; Spira, 2001; Aizen *et al.*, 2002). Les perturbations anthropiques telles que la fragmentation des habitats, les changements d'utilisation des terres, les pesticides, les espèces invasives (plantes et pollinisateurs) et le réchauffement climatique, entre autres, peuvent avoir des conséquences néfastes sur les populations de plantes et de pollinisateurs et leurs interactions, entraînant chaque partenaire dans une spirale d'extinction (Biesmeijer *et al.*, 2006). Les changements globaux actuels engendrent donc de nouveaux défis concernant les interactions plantes-pollinisateurs, essentielles au fonctionnement de la plupart des écosystèmes terrestres (Ollerton *et al.*, 2006; Potts *et al.*, 2006; Kremen *et al.*, 2007; Schweiger *et al.*, 2010) et l'évolution des systèmes de reproduction (Eckert *et al.*, 2010).

Quels seront les effets d'une réduction de l'abondance et de la diversité des plantes et des pollinisateurs sur les interactions biotiques de la communauté (plantes-plantes et plantes-pollinisateurs) et les implications pour la pollinisation, les systèmes de reproduction, les flux de gènes et la survie des populations ?

Quels mécanismes écologiques et évolutifs peuvent compenser la limitation de la pollinisation résultant de ces perturbations ?

L'objectif principal de ce travail est d'explorer les causes et les conséquences de la limitation de la pollinisation (transfert de pollen entre les individus) ainsi que d'étudier les processus écologiques et évolutifs permettant éventuellement de la compenser. L'originalité du projet réside dans son approche intégrée, qui prend en compte les caractéristiques des populations de l'espèce cible, de la communauté de plantes environnante et de la communauté de pollinisateurs, afin de mesurer leurs effets proximaux sur la pollinisation et la réalisation du système de reproduction. Il s'agira aussi de mesurer leurs effets ultimes sur la structure génétique des populations et l'évolution du système de reproduction. Si de nombreuses études ont étudié chacun de ces processus indépendamment, très peu ont considéré l'effet conjoint de ces différents facteurs sur un même modèle d'étude (figure 1). Notre étude se place à l'échelle de la communauté, afin de caractériser les interactions interspécifiques entre plantes via le

partage des pollinisateurs. Ces interactions jouent un rôle déterminant dans la compréhension des causes et des conséquences d'un échec de la pollinisation (Geber & Moeller, 2006).

Dans un premier temps, je donnerai une vue d'ensemble des causes et des conséquences d'une limitation de la reproduction sexuée par la pollinisation afin de souligner la généralité de ce processus pour les espèces dépendantes d'un mutualiste pour la transmission du pollen. Dans un second temps, je m'intéresserai aux mécanismes agissant à l'échelle de la plante, de la population ou de la communauté, capables de compenser cette limitation chez les espèces entomogames.

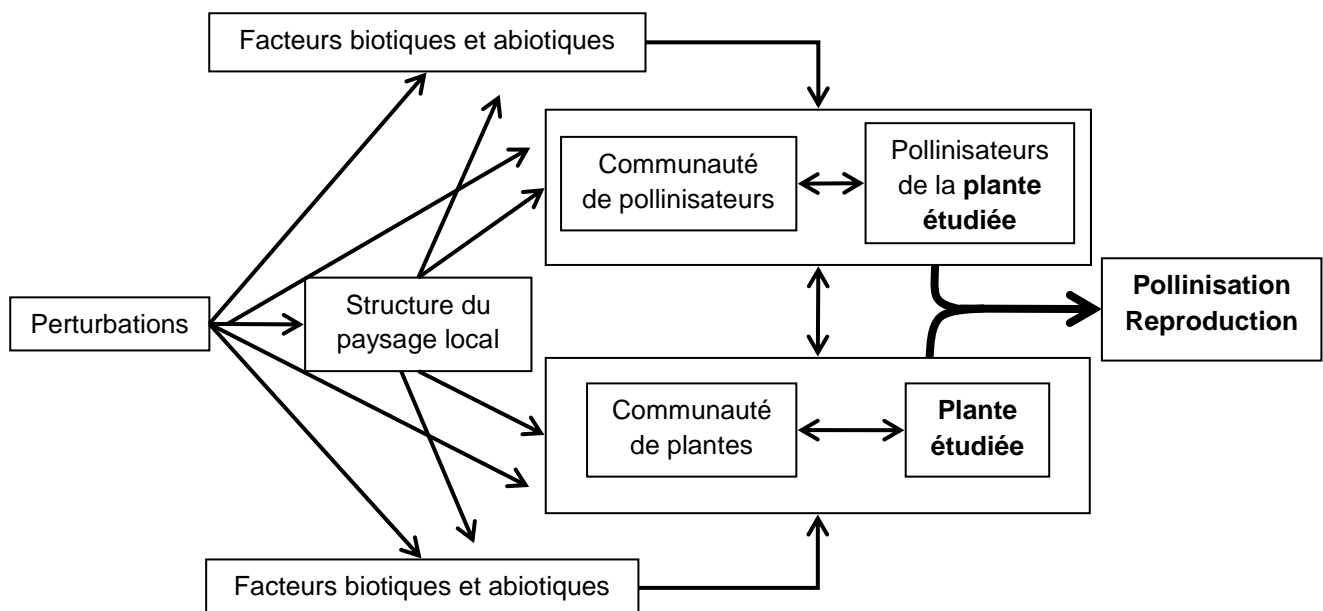


Figure 1. Contexte de l'étude : une plante modèle au sein d'un réseau d'interactions.

Figure élaborée à partir d'un schéma conceptuel de (Kremen *et al.*, 2007). Les flèches indiquent les relations existantes entre les différentes composantes du système.

2. LA POLLINISATION, FACTEUR LIMITANT DE LA REPRODUCTION SEXUÉE

2.1 La limitation de la pollinisation : définition et mécanismes impliqués

La pollinisation, première étape dans la formation des graines, devient limitante lorsque le pollen est déposé en trop faible quantité ou qualité pour que tous les ovules soient fécondés (Ashman *et al.*, 2004; Knight *et al.*, 2005). Il a longtemps été considéré que la principale limite de la reproduction sexuée était la disponibilité en ressources (« *Bateman's principale* », (Bateman, 1948). Cependant, des synthèses bibliographiques de ces dernières décennies (Burd, 1994; Larson & Barrett, 2000) ont révélé que le succès reproducteur des plantes était limité par le dépôt de pollen, au moins à un instant t de leur cycle de vie. Les deux principales causes de cette limitation évoquées sont (i) **un manque de pollinisateurs** induisant une trop faible quantité de pollen déposé (Aizen & Feinsinger, 1994; Aizen & Feinsinger, 2003) et (ii) **un manque de partenaires conspécifiques pour la reproduction** limitant la quantité et/ou la qualité de pollen déposé (Cunningham, 2000; Duncan *et al.*, 2004; Aizen & Harder, 2007). Ces deux composantes de la limitation de la pollinisation ne sont que très rarement dissociées dans les études expérimentales bien que nous le verrons, elles puissent avoir des conséquences divergentes sur la pollinisation et la reproduction sexuée des plantes et exercer différentes contraintes évolutives sur les systèmes de reproduction (Eckert *et al.*, 2010; Cheptou, 2011).

Dans la littérature, il est reconnu que les espèces autocompatibles sont moins sensibles aux perturbations de leurs populations que les espèces auto-incompatibles (Aguilar *et al.*, 2006). Ce constat est dû au fait que ces espèces sont capables de s'autopolliniser et par conséquent de compenser un échec de la pollinisation par manque de pollinisateurs et/ou de partenaires pour la reproduction (hypothèse de l'assurance de reproduction qui sera décrite dans la seconde partie de cette introduction). Cependant, les pressions de sélection sur les systèmes de reproduction de ces espèces dépendent de l'origine (limitation en pollinisateurs et/ou en partenaires) et de l'ampleur de la limitation de la pollinisation. Pour mesurer la limitation de la pollinisation chez une espèce autocompatible, il est possible de mesurer la **limitation en transfert de pollen** grâce à **l'exclusion de l'autopollinisation** (voir encadré 1). L'identification des causes et des conséquences d'un échec de la pollinisation chez les espèces

autocompatibles permettrait de mieux comprendre l'évolution des systèmes de reproduction dans le contexte actuel (Eckert *et al.*, 2010).

Tout d'abord, il est important de noter que d'une manière générale, un échec de la pollinisation peut se produire à toutes les étapes de la dispersion du pollen (figure 2).

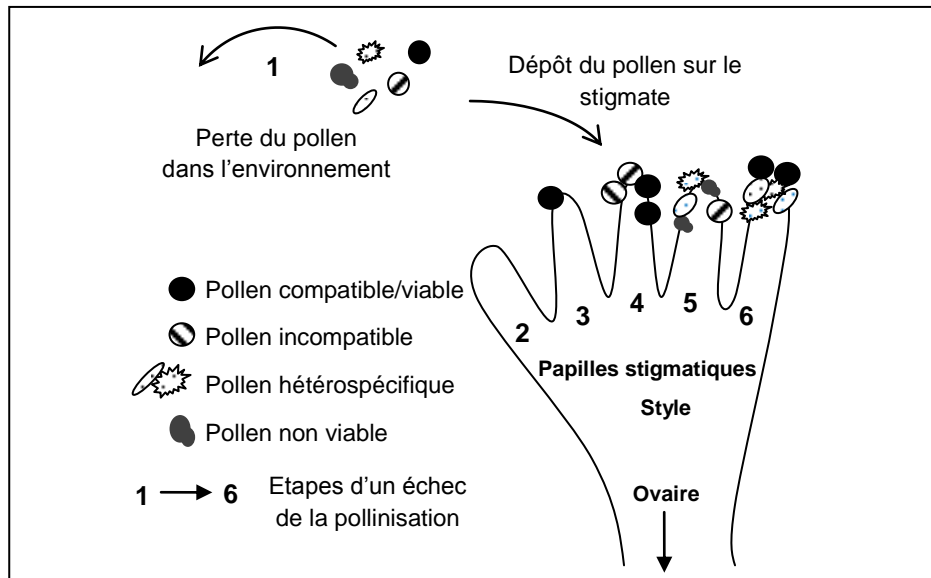


Figure 2. Les causes d'un échec de la pollinisation.

(1) Échec prédispersion. (2) Absence de dispersion. (3-6) Échec postdispersion. (3) Faible quantité de pollen déposé. (4) Faible qualité de pollen déposé. (5) Déposition de pollen non viable, incompatible ou hétérospécifique. (6) Présence de pollen hétérospécifique. D'après (Wilcock & Neiland, 2002).

Une première condition pour que la pollinisation ait lieu réside dans la probabilité que le pollen soit déposé sur le stigmate (cas n° 1 et 2, figure 2). Un échec total de la pollinisation a lieu si les insectes pollinisateurs sont absents, s'ils stockent une partie du pollen récolté dans les corbeilles à pollen avant toute possibilité de dispersion (« *pollinator grooming* » chez les hyménoptères particulièrement ; Harder, 1990), si le pollen est consommé (Harder & Routley, 2006) ou stérile (Shivanna & Johri, 1989). Une fois que le pollen est déposé, plusieurs facteurs peuvent limiter la fécondation des ovules disponibles (cas n° 3 à 6).

Une trop faible quantité (cas n° 3) ou une trop faible qualité (cas n° 4) de pollen conspécifique déposé conduisent toutes deux à un faible succès reproducteur. Ce n'est que récemment que les limitations en qualité et en quantité de pollen ont été dissociées dans les études portant sur la limitation en pollen (Aizen & Harder, 2007). Pour une espèce auto-incompatible ou lorsque la dépression de consanguinité est forte, un pollen de mauvaise

qualité sera par exemple issu du même individu génétique (autogamie ou geitonogamie) ou d'un individu génétiquement proche (Charlesworth & Charlesworth, 1987; Griffin & Eckert, 2003; Herlihy & Eckert, 2004). En effet, les grains de pollen reçus ou les zygotes seront sélectionnés selon leur qualité à différents stades selon les espèces. L'auto-incompatibilité (dans la plupart des cas sous le contrôle d'un seul locus multiallélique appelé locus S) conduit au rejet de l'autopollen ou des ovules autofécondés (Dickinson, 1994; de Nettancourt, 1997). Une auto-incompatibilité cryptique peut également jouer sur la croissance des tubes polliniques issus d'autopollen (Cruzan & Barrett, 1993; Eckert & Allen, 1997). Enfin, la sélection des embryons pourra être faite par une allocation différentielle des ressources entre les embryons issus d'allofécondation ou d'autofécondation (Rigney, 1995; Korbecka *et al.*, 2002) ou la mort d'embryons autofécondés par l'expression d'allèles récessifs (dépression de consanguinité précoce) (Lande *et al.*, 1994; Husband & Schemske, 1996). Il est par contre difficile de mettre en évidence le(s) processus en cause (Seavey & Bawa, 1986). De plus, et nous le verrons dans la seconde partie de cette introduction, la valeur sélective d'une plantule issue d'une fécondation consanguine est généralement réduite par rapport à celle de descendants issus de fécondation croisée (dépression de consanguinité) (Charlesworth & Charlesworth, 1987).

Par ailleurs, un dépôt de pollen non viable ou impropre (hétérospécifique ou incompatible) (cas n° 5) ne permettra pas la fécondation des ovules. Le pollen peut perdre rapidement sa viabilité lorsqu'il a été collecté, surtout s'il est transporté pendant de longues périodes avant d'être déposé (Dafni & Firmage, 2000). La composition de la communauté environnante de la plante cible et la constance des pollinisateurs (Chittka *et al.*, 1999) vont déterminer l'ampleur du transfert de pollen hétérospécifique et donc non compatible avec la plante visitée (Morales & Traveset, 2008).

Lorsqu'un mélange de pollen est déposé sur le stigmate (cas n° 6), le pollen hétérospécifique peut empêcher le pollen conspécifique de germer soit par inhibition chimique (allélopathie), soit par inhibition physique (« *pollen clogging* », Morales & Traveset, 2008).

2.2 La limitation en pollinisateurs

La reproduction sexuée est limitée par la disponibilité en pollinisateurs lorsque la plante ne reçoit pas assez de visites pour que soit déposée une quantité suffisante de pollen conspécifique (Kalisz & Vogler, 2003). Un faible transfert de pollen (pollen déposé uniquement par les pollinisateurs) peut se produire dans le cas (i) d'un déclin de pollinisateurs (diversité et abondance) suite aux perturbations du milieu, (ii) de la présence de pollinisateurs « exploités » du mutualisme (iii), d'une faible attractivité des populations de plantes pour les insectes pollinisateurs, (iv) d'une compétition intraspécifique entre fleurs du même individu ou d'individus différents lorsque le nombre de fleurs surpasse le nombre de visites possibles ou (v) d'une forte compétition interspécifique entre espèces de la communauté partageant les mêmes pollinisateurs. Nous aborderons ici uniquement les causes d'un manque de pollinisateurs. Les conséquences écologiques seront abordées à la fin de la première partie de cette introduction et les conséquences évolutives dans sa seconde partie.

2.2.1 Déclin des pollinisateurs

Il ne fait maintenant plus aucun doute que le contexte actuel, au travers d'un ensemble de perturbations anthropiques toujours plus intenses, a de nombreux impacts négatifs sur la diversité et l'abondance des pollinisateurs (Winfrey *et al.*, 2009; Potts Biesmeijer *et al.*, 2010). Ces conséquences se répercutent sur la pollinisation et la reproduction des plantes concernées, qu'elles soient sauvages (Aguilar *et al.*, 2006; Dauber *et al.*, 2010) ou cultivées (Ghazoul, 2005a; c; Kremen *et al.*, 2007). La perte d'habitats, les changements d'utilisation des terres, les pesticides, la fragmentation des habitats, le réchauffement climatique ou encore la présence d'espèces invasives jouent le plus souvent de concert sur les communautés de pollinisateurs (Diekötter *et al.*, 2007; Schweiger *et al.*, 2010). Ces perturbations seraient la cause d'un déclin des abeilles domestiques aux États-Unis (Van Engelsdorp *et al.*, 2008) et en Europe (Potts *et al.*, 2010), des abeilles sauvages et des syrphes au Royaume-Uni et en Hollande (Biesmeijer *et al.*, 2006) et des bourdons en Belgique et au Royaume-Uni (Rasmont & Mersch, 1988; Goulson *et al.*, 2008). Si un déclin des pollinisateurs a été observé à l'échelle globale, les résultats sont plus controversés à l'échelle régionale ou locale. Des réponses contrastées à la fragmentation des habitats ont été mise en évidence selon l'espèce de pollinisateur considérée, incitant la communauté scientifique à s'intéresser aux caractéristiques et besoins propres de chaque espèce (Cane, 2001; Cane *et al.*, 2006; Brosi *et*

al., 2008). Une méta-analyse récente (Winfree *et al.*, 2009) révèle une réduction de la diversité des abeilles (au sens large, les apoïdes) avec la fragmentation des habitats, mais uniquement lorsque ces derniers sont extrêmement fragmentés, ou du moins de faible amplitude dans les autres situations. Dans certains cas, la fragmentation pourrait modifier la composition en espèces sans affecter ni l'abondance des pollinisateurs, ni les taux de visites. Par exemple, dans le cas où les espèces présentes dans les populations fragmentées sont aussi efficaces dans le transfert de pollen que les espèces présentes dans les populations non perturbées.

2.2.2 *Tricherie*

L'exploitation des mutualismes est un phénomène courant, y compris entre les plantes à fleurs et leurs pollinisateurs (Inouye, 1983; Bronstein, 2001). Les pollinisateurs tricheurs exploitent le mutualisme en collectant le nectar (perforation de la corolle) ou le pollen (consommation) sans assurer leur service de pollinisation (Inouye, 1980; Maloof & Inouye, 2000; Irwin *et al.*, 2001). Les implications du vol de pollen ont été très peu étudiées, bien que ses conséquences sur la reproduction soient directes, contrairement au vol de nectar (Hargreaves *et al.*, 2009). Il a été mis en évidence que le vol de nectar peut avoir des conséquences négatives, neutres et positives sur le succès reproducteur des plantes (Maloof & Inouye, 2000; voir également Irwin *et al.*, 2001). Le succès reproducteur peut être réduit du fait des dommages causés aux structures florales (McDade & Kinsman, 1980) ou de la perturbation du comportement des pollinisateurs légitimes (Reddy *et al.*, 1992). À l'opposé, le succès reproducteur et plus particulièrement la valeur sélective des individus peuvent bénéficier de la présence de tricheurs, si celle-ci pousse les pollinisateurs légitimes à visiter moins de fleurs sur chaque individu, réduisant ainsi la geitonogamie (de Jong *et al.*, 1993). Les études sur l'effet du vol de nectar sur la reproduction des plantes peuvent inclure des manipulations expérimentales (percer les corolles manuellement et prélever le nectar sur une proportion connue des fleurs ; Irwin & Brody, 1999) ou des quantifications de dommages aux corolles en population naturelle (Irwin & Brody, 1998). Même si nous ne quantifierons pas le vol de nectar dans ce projet de thèse, il est important de noter le rôle d'un tel processus dans la limitation de la pollinisation. Notons également, que des plantes tricheuses attirent les pollinisateurs pour la dispersion de pollen sans leur offrir de récompenses (orchidées trompeuses par exemple ; Dormont *et al.*, 2010). Ces plantes vont mimer d'autres plantes nectarifères de la communauté ou imiter la morphologie et les couleurs des insectes pollinisateurs (mime d'un partenaire

pour la reproduction) et n'auront pas à payer le coût associé à la production de récompenses (Gigord *et al.*, 2002; Thakar *et al.*, 2003).

2.2.3 Faible attractivité des populations et effet Allee

Les populations isolées, de petites tailles et/ou de faible densité sont peu attractives pour les pollinisateurs, car elles offrent une faible quantité de ressources et ne peuvent donc abriter qu'une faible diversité et abondance d'insectes (Jennersten, 1988; Kunin, 1997; Dauber *et al.*, 2010). Dans ces populations, il existe en théorie une relation positive entre la disponibilité en fleurs (fonction de la taille et de la densité des patches ou des populations) et les taux de visites. Cette relation est nommée l'effet Allee³ (figure 3, première partie de la courbe). L'effet Allee conduit donc à une diminution de la limitation en pollinisateurs avec l'augmentation de la taille et de la densité des populations de plantes (Rathcke, 1983). Par ailleurs, il a également été montré que les pollinisateurs visitent parfois plus de fleurs sur chaque individu lorsque la distance entre les individus augmente. Ce comportement peut compenser l'isolement des individus mais également favoriser la geitonogamie (Snow *et al.*, 1996).

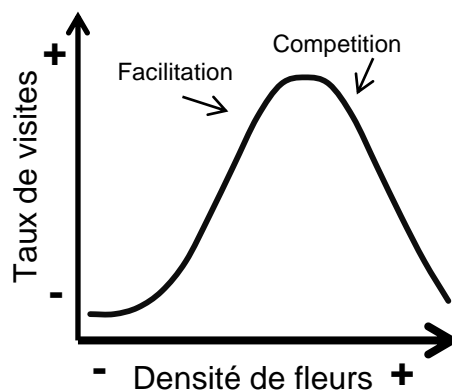


Figure 3. Relation entre le taux de visites et la densité de fleurs des populations.

Daprès Rathcke, 1983.

³ L'effet Allee a été décrit en 1931 par le zoologiste et écologiste américain Warder Clyde Allee (1885-1955).

2.2.4 Compétition intraspécifique

Lorsque le nombre de fleurs disponibles augmente plus rapidement que le nombre de pollinisateurs disponibles, la compétition intraspécifique entre fleurs conduit à une réduction du taux de visites par fleur (Rathcke, 1983) (figure 3, deuxième partie de la courbe). La proportion de fleurs visitées diminue avec la quantité de fleurs présentes sur un individu (Schmit, 1983; Schmid-Hempel & Speiser, 1988) et la probabilité que chaque fleur reçoive suffisamment de visites pour que tous les ovules soient fécondés est alors très faible (Feldman, 2006). Les espèces à floraison massive qui peuvent offrir des milliers de fleurs aux pollinisateurs dès que la population atteint une certaine taille et densité ou même à l'échelle de l'individu pour certains arbustes devraient être particulièrement sensibles à cette limitation.

2.2.5 À l'échelle de la communauté: compétition interspécifique

Lorsque le taux de visites d'espèces cofleurissantes partageant des pollinisateurs est réduit, on parle d'interaction écologique négative ou de compétition interspécifique pour le service de pollinisation (figure 4, composante « quantité »). D'autres mécanismes peuvent être à l'origine d'une compétition interspécifique sans pour autant impliquer une limitation en pollinisateurs : par exemple, un flux de pollen hétérospécifique et une perte de pollen conspécifique sur les stigmates d'autres espèces (voir la limitation en partenaires sexuels ci-dessous et figure 4). Un grand nombre d'espèces de plantes et de pollinisateurs interagissent au sein des communautés et cette complexité rend la mise en place d'expérimentations difficile. Des travaux récents, basés sur la théorie des réseaux⁴, ont décrit les interactions plantes-pollinisateurs à l'échelle de la communauté (voir Bascompte *et al.* 2009) mais ne prennent en compte ni la quantité ni la qualité des visites. La plupart des études s'intéressant aux interactions entre deux ou quelques espèces de plantes et c'est seulement depuis quelques années que des approches à l'échelle de la communauté se sont développées (Moeller & Geber, 2005; Geber & Moeller, 2006; Sargent & Ackerly, 2008). Néanmoins, la relation entre les caractéristiques des communautés, les interactions plantes-pollinisateurs et la limitation de la pollinisation y est peu considérée (quelques exceptions cela dit : Vamosi *et al.*, 2006; Hegland & Totland, 2008; Sargent *et al.*, 2011).

⁴ La théorie des réseaux permet l'identification de différents paramètres décrivant les propriétés des réseaux d'interactions. Par exemple : le nombre de liens existants entre les espèces, la compartimentalisation du réseau, le degré d'agrégation des liens, la force des liens, la symétrie du réseau. Voir Olesen & Jordano (2002) et Thebault & Fontaine (2010) entre autres.

Parmi les caractéristiques des communautés qui sont considérées comme des paramètres clés pour les interactions plantes-pollinisateurs dans les communautés végétales, nous pouvons citer : la richesse spécifique (Vamosi *et al.*, 2006), les caractéristiques des espèces (traits floraux par exemple, Pleasants, 1980; McCall & Primack, 1992), la densité florale (Hegland *et al.*, 2009), la pureté de la communauté⁵ et l'arrangement spatial des espèces (degré d'agrégation spatiale ; Ghazoul, 2005b), et plus récemment les relations phylogénétiques au sein de la communauté (Sargent & Ackerly, 2008; Sargent *et al.*, 2011).

Il a par exemple été mis en évidence à une échelle globale (méta-analyse), que la richesse spécifique des communautés peut conduire à une forte limitation en pollen, la cause étant un manque de visites reçues et un transfert de pollen hétérospécifique (Vamosi *et al.*, 2006). La richesse spécifique a classiquement été utilisée pour explorer le rôle d'une communauté environnante de plantes dans le fonctionnement des écosystèmes (Hooper *et al.*, 2005). Néanmoins, il a récemment été mis en évidence que les relations phylogénétiques au sein d'une communauté pouvaient jouer un rôle majeur dans les interactions plantes-pollinisateurs et la pollinisation d'une espèce cible par rapport à la richesse spécifique (Schuett & Vamosi, 2010; Sargent *et al.*, 2011). La phylodiversité (Webb *et al.*, 2002) représente les relations évolutives entre les espèces d'une communauté et prend en compte le fait que les espèces proches partageraient des traits fonctionnels et écologiques similaires (Wiens *et al.*, 2010), ce qui n'est pas pris en compte dans les mesures de diversité taxonomique. Généralement, la probabilité que des espèces phénotypiquement (phylogénétiquement) proches soient en compétition pour le service des pollinisateurs est plus importante que pour des espèces différant par leurs traits floraux (couleur, morphologie et odeur florale, par exemple) qui seraient visitées par des insectes différents (Sargent & Ackerly, 2008). La probabilité que des espèces pollinisées par des pollinisateurs spécialistes ou constants⁶ pâtissent de la compétition pour les services de pollinisation est donc plus faible que pour les espèces pollinisées par des pollinisateurs généralistes et non constants (Sargent & Otto, 2006).

La compétition a longtemps été considérée comme une règle générale au sein des communautés (« *the struggle for existence* », Darwin 1859) mais nous verrons dans la

⁵ Proportion relative d'une espèce cible par rapport aux autres espèces

⁶ Un pollinisateur spécialiste est un pollinisateur qui dépend d'une famille, d'un genre ou d'une espèce de plante même si cette ou ces plantes peuvent être pollinisées par d'autres types d'insectes. Un pollinisateur constant est un insecte qui visite préférentiellement une espèce lors d'une période de butinage.

seconde partie de cette introduction que les interactions de facilitation peuvent également jouer un rôle clé dans la pollinisation.

2.3 La limitation en partenaires pour la reproduction

La quantité et la qualité de pollen conspécifique disponible dans la population peut-être insuffisante pour que les pollinisateurs, même abondants, déposent suffisamment de pollen viable et compatible pour que tous les ovules soient fécondés. Cela peut être dû à une réduction de l'abondance et de la densité des plantes conspécifiques (quantité) ou à une réduction de la diversité des partenaires sexuels (qualité) (Duncan *et al.*, 2004; Campbell & Husband, 2007; Wagenius & Lyon, 2010). Pour plus de clarté, je regrouperai dans ce paragraphe la limitation en quantité et en qualité de plantes conspécifiques sous le même terme de « limitation en partenaires pour la reproduction ».

Une réduction de la disponibilité en partenaires pour la reproduction est généralement causée par une réduction de la taille et de la densité des populations de plantes et une augmentation de leur isolement. Cela peut résulter, par exemple, de la fragmentation des habitats ou des populations (Ghazoul, 2005b). Un déclin global des populations de plantes en relation avec les perturbations anthropiques actuelles a été mis en évidence (McCollin *et al.*, 2000; Loreau *et al.*, 2001). Au Royaume-Uni et aux Pays-Bas, un déclin parallèle entre pollinisateurs et plantes entomogames a également été mis en évidence suggérant un lien de causalité entre le déclin de ces deux partenaires du mutualisme (Biesmeijer *et al.*, 2006). Les plantes semblent toutefois moins sensibles que les pollinisateurs à la perte et à la fragmentation des habitats (Taki & Kevan, 2007). Selon les perturbations, une réduction en partenaires sexuels peut être associée à une réduction en pollinisateurs, ce qui représente un cas extrême de limitation de la pollinisation (Eckert *et al.*, 2010). Notons que les plantes à floraison massive ou à croissance clonale peuvent maintenir une certaine disponibilité en fleurs, densité et taille de populations pouvant compenser l'isolement des individus.

La réduction de l'abondance de l'espèce cible au sein d'une communauté de plantes conduit les pollinisateurs à visiter un plus grand nombre d'espèces cofleurissantes, ce qui entraîne une perte de pollen conspécifique, une augmentation du flux de pollen hétérospécifique ou une simple réduction des taux de visites (Waser, 1983; Fishman & Wyatt, 1999; Morales & Traveset, 2008). Le partage des pollinisateurs conduit dans ce cas à de la compétition

interspécifique (figure 4) qui peut donc aboutir à une limitation en pollinisateurs (voir ci-dessus) et/ou à une limitation en pollen conspécifique. De plus, les visites répétées aux quelques individus présents entraînent une augmentation du flux de pollen consanguin. La consanguinité peut diminuer la valeur sélective des plantes autocompatibles si la dépression de consanguinité est forte⁷, et diminuer le succès reproducteur de plantes auto-incompatibles (Thomson, 1981; Waser & Price, 1983).

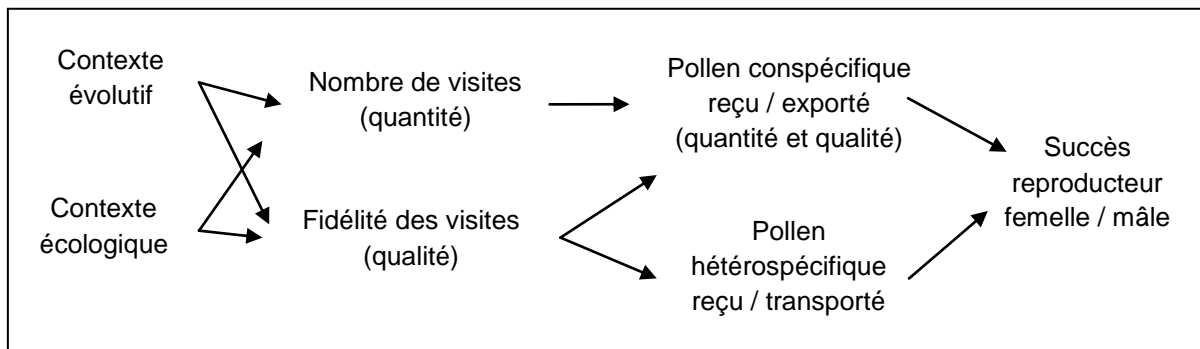


Figure 4. Les mécanismes de compétition dans la pollinisation.

Le contexte écologique de la plante cible inclut les variations de l'abondance des pollinisateurs, celles du nombre de plantes conspécifiques et hétérospécifiques et celle de leur proximité. Le contexte évolutif prend en compte les variations phénotypiques intrinsèques des organismes en interaction : comportement et morphologie des pollinisateurs et morphologie des fleurs visitées. La fidélité des pollinisateurs détermine la quantité et les propriétés génétiques du pollen conspécifique et la quantité de pollen hétérospécifique déposé. Schéma modifié à partir de (Mitchell *et al.*, 2009).

2.4 Limitation en pollinisateurs et limitation en partenaires pour la reproduction : quelles en sont les conséquences et comment les distinguer ?

D'une manière générale, un échec de la pollinisation (ou limitation en transfert de pollen) se traduit par un faible succès reproducteur et une diminution de la valeur sélective des individus. Peu d'études se sont intéressées à **la contribution relative de la limitation en pollinisateurs et de la limitation en partenaires en populations naturelles** à un échec de la pollinisation (Moeller, 2004; Campbell & Husband, 2007). Or, dans le contexte de changements globaux actuels, il est primordial de comprendre les causes et les conséquences écologiques et évolutives de ces deux facteurs (Eckert *et al.*, 2010; Cheptou, 2011).

⁷ La dépression de consanguinité sera détaillée dans la seconde partie de l'introduction

Tableau 1. Conséquences d’une réduction des pollinisateurs et/ou des partenaires pour la reproduction sur les pressions de sélection jouant sur les systèmes de reproduction : intensité et variabilité (σ^2) de la limitation en transfert de pollen, PTL ; quantité et qualité des charges polliniques stigmatiques, CPs.

		Disponibilité en pollinisateurs	
		Forte	Faible
Disponibilité en partenaires	Forte	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de PTL • σ^2 en PL faible • CPs élevées • % pollen conspécifique déposé élevé 	<ul style="list-style-type: none"> • PTL élevée • σ^2 en PL forte • CPs faibles • % pollen conspécifique déposé élevé
	Faible	<ul style="list-style-type: none"> • PTL élevée • σ^2 en PL forte • CPs élevées* • % pollen conspécifique déposé faible* 	<ul style="list-style-type: none"> • PTL élevée • σ^2 en PL faible • CPs faibles • % pollen conspécifique déposé faible

*Selon le comportement des pollinisateurs (voir texte).
D’après Eckert *et al.* 2010.

Plusieurs cas de figure peuvent être considérés (tableau 1):

(i) Lorsque les partenaires sexuels ne sont pas limitants, **une faible disponibilité en pollinisateurs** aura pour conséquence de réduire la quantité moyenne de pollen conspécifique déposé sur les stigmates, ce qui conduit à une limitation en transfert de pollen de forte amplitude mais très variable d’un individu à l’autre du fait de l’imprédictibilité des visites (Eckert *et al.*, 2010). Le pollen disponible n’étant pas le facteur limitant, chaque pollinisateur pourra être porteur d’une charge pollinique moyenne élevée et pure. Cependant, la probabilité de visites étant faible, de faibles charges polliniques seront déposées en moyenne sur chaque stigmate.

(ii) À l’opposé, lorsque les pollinisateurs ne sont pas limitants mais que **la disponibilité des partenaires pour la reproduction est réduite**, plusieurs scénarios peuvent conduire à une forte limitation en transfert pollen (Duncan *et al.*, 2004; Campbell & Husband, 2007; Wagenius & Lyon, 2010). (ii.a) Si les plantes cofleurissantes partagent des pollinisateurs (et que ceux-ci ne sont pas constants lors d’une même période de collecte), de grandes charges polliniques seraient déposées sur les stigmates, mais elles comprendraient une faible proportion de pollen conspécifique. Dans ce cas précis, les pollinisateurs porteraient des charges polliniques mixtes reflétant leur degré de fidélité aux plantes visitées. Notons que la

relation entre les charges polliniques portées par les pollinisateurs et déposées sur les stigmates en population naturelle reste encore mal connue. De plus, l'intensité de la limitation en transfert de pollen sera très variable d'un individu à l'autre selon le type de pollen déposé. (ii.b) Toutefois, si les plantes ne partagent pas de pollinisateurs où si ceux-ci sont constants (certains bourdons par exemple ; Chittka *et al.* 1999), chaque fleur recevant en théorie un nombre élevé de visites, la quantité de pollen disponible pour chaque pollinisateur serait réduite et une faible quantité moyenne de pollen conspécifique serait transportée par chaque insecte et déposée sur les stigmates. (ii.c) Dans le cas où c'est la qualité du pollen conspécifique qui est limitante (pollen non viable ; autopollen et pollen issu d'individus reliés génétiquement pour les plantes auto-incompatibles ou lorsque la dépression de consanguinité est forte pour les plantes autocompatibles), la limitation en pollen sera forte indépendamment de la quantité de pollen conspécifique déposé.

(iii) Enfin, lorsque la limitation en pollinisateurs s'associe à une limitation en partenaires pour la reproduction, la limitation en transfert de pollen serait forte et peu variable entre les individus, car la probabilité qu'un individu reçoive une visite et qu'une quantité suffisante de pollen conspécifique soit déposée est faible.

Afin de distinguer ces deux types de limitation, il est important de ne pas se limiter à l'estimation de la production de graines. En effet, l'étude de la quantité et de la qualité des charges polliniques transportées par les pollinisateurs et déposées sur les stigmates apparaît comme une étape cruciale dans l'identification des mécanismes conduisant à une limitation de la pollinisation. Il serait ainsi possible de distinguer la quantité relative de pollen conspécifique et hétérospécifique. Par contre, il est plus difficile de distinguer les grains d'autopollen et d'allopollen qui ont souvent le même aspect (voir cependant le cas des espèces hétérostyles entre autres ; Dowrick, 1956). Étudier uniquement le taux de visites, même associé au succès reproducteur femelle (production de graines), ne permet pas de mettre en évidence une relation de causes à effet entre la limitation en pollen et son origine puisque le taux de visites n'est pas forcément indicateur de la quantité ni la qualité du pollen déposé. La limitation en pollen constitue une forte pression de sélection sur les systèmes de reproduction. Plus particulièrement, l'origine de cette limitation (réduction de la disponibilité en pollinisateurs et/ou en plantes conspécifiques) pourrait conduire à des réponses évolutives différentes (Eckert *et al.*, 2010; Cheptou, 2011). Je vais m'intéresser à présent aux mécanismes pouvant permettre de compenser la limitation de la pollinisation et aux conséquences évolutives de cette limitation sur les systèmes de reproduction.

3. QUELS MÉCANISMES PEUVENT COMPENSER LA LIMITATION DE LA POLLINISATION ?

3.1 Assurance de la reproduction et évolution de l'autofécondation

Lorsque la pollinisation devient un facteur limitant, la probabilité de reproduction diminue avec la probabilité de transfert du pollen. **L'autofécondation peut être un moyen permettant d'assurer la reproduction lorsque les pollinisateurs ou les partenaires sexuels sont peu abondants.** Darwin (1876) a été le premier à proposer l'hypothèse de l'assurance de reproduction comme moteur de l'évolution de l'autofécondation. Il suggère que l'autofécondation donne un avantage sélectif aux espèces autogames lorsque les pollinisateurs ou les partenaires sexuels sont rares.

Un cas particulier de cette hypothèse est illustré par les travaux de Baker (1955) qui font le lien entre la dispersion et la reproduction. Baker suggère que les espèces colonisatrices de longue distance devraient être autogames, l'autofécondation permettant la reproduction sexuée à partir d'un seul individu arrivant dans un nouvel habitat où les partenaires sexuels ainsi que les pollinisateurs sont rares (« *Baker's rule* », Baker, 1959 ; 1967)⁸. Cependant, les études empiriques menées sur les espèces colonisatrices n'ont pas conforté l'hypothèse d'un avantage sélectif des espèces autogames lors de la colonisation de nouveaux milieux et il ne semble pas y avoir de consensus général concernant le modèle de Baker (Price & Jain, 1981; Cheptou *et al.*, 2002; Busch, 2011; Cheptou, 2011; Massol & Cheptou, 2011). Il a également été proposé que les populations en marges de l'aire de répartition de l'espèce seraient de plus petites tailles, de plus faible densité et plus isolées que les populations proches du centre de l'aire de répartition (« *abundant center model* », Hengeveld & Haeck, 1982; Brown, 1984; Lawton, 1993). Ce contexte écologique privilégierait l'évolution de l'autofécondation pour les raisons évoquées ci-dessus (Antonovi, 1968; Schoen *et al.*, 1996; Barrett, 2002).

La sélection de l'autofécondation comme mécanisme d'assurance de reproduction est également dépendante de la variabilité génétique de la population pour certains traits floraux permettant de faciliter le dépôt d'autopollen en l'absence de pollinisateurs (Kalisz *et al.*, 1999;

⁸ On peut également noter que cette hypothèse ne se restreint pas aux plantes et peut s'appliquer à d'autres modèles biologiques comme certaines crevettes d'eau douce vivant dans des plans d'eau éphémères (Baker 1955).

Runions & Geber, 2000). Une réduction de la séparation spatiale (herchogamie; voir figure 5) et/ou temporelle (dichogamie) entre les organes mâles et femelles de la fleur permet d'augmenter les capacités d'autofécondation spontanée (Moeller, 2006; Brys & Jacquemyn, 2011) et de réduire l'allofécondation (Karron *et al.*, 1997). De plus, la taille de la corolle peut varier en fonction du degré d'autogamie, une réduction de la corolle pouvant favoriser la proximité des organes mâles et femelles et diminuer les ressources allouées inutilement à l'attraction des pollinisateurs (van Kleunen & Ritland, 2004; Kennedy & Elle, 2008; voir figure 5). Enfin, le rapport pollen/ovules (P/O ; Cruden, 1977) donne une indication sur le degré d'autogamie, les plantes autogames allouant moins de ressources à la fonction mâle (production de pollen) par rapport à la fonction femelle (production d'ovules) (Lloyd, 1987; Michalski & Durka, 2009).

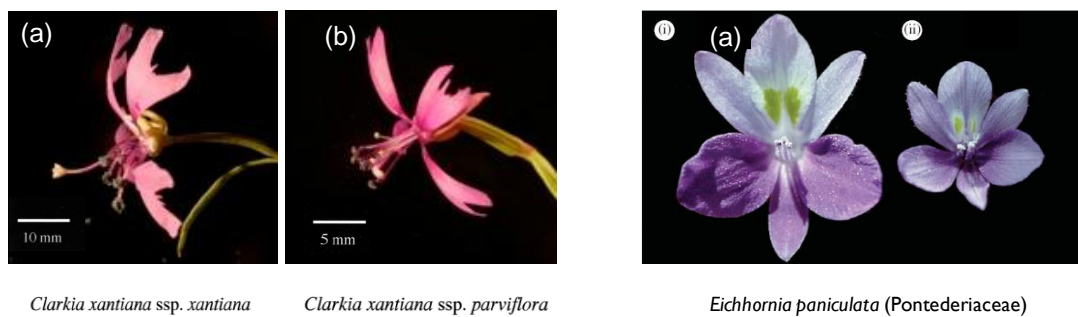


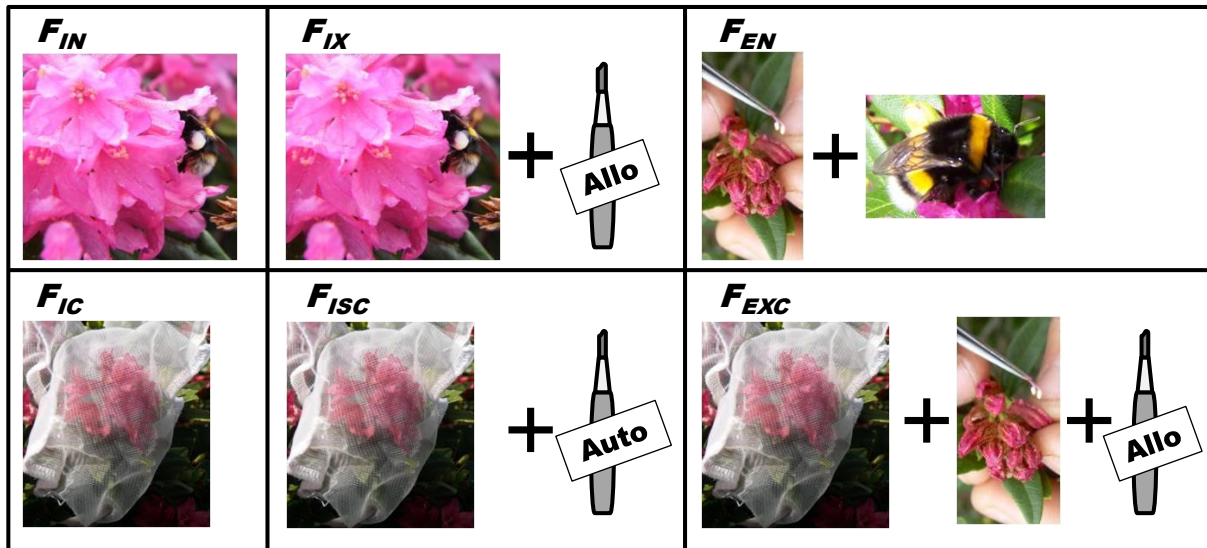
Figure 5. Exemples d'espèces possédant un phénotype allogame (a) et un phénotype autogame (b).

L'exemple de *Clarkia* est tiré de (Moeller & Geber, 2005) et l'exemple d'*Eichhornia* de (Barrett, 2010b).

Il est important de noter que selon les causes de la limitation de la pollinisation (pollinisateurs *versus* partenaires sexuels), différents modes d'autogamie peuvent être impliqués dans l'assurance de reproduction. Lorsque les pollinisateurs sont limitants, seule l'autogamie spontanée peut assurer la reproduction (voir cependant Anderson *et al.*, 2003). L'assurance de reproduction est alors dépendante des capacités de l'individu à se reproduire sans l'intervention d'insectes pollinisateurs (autofertilité, encadré 1). Dans ce cas, le degré d'autocompatibilité et la proximité spatiale et temporelle des organes mâles et femelles sont soumis à sélection.

Encadré 1. Estimation des paramètres de pollinisation

Six traitements floraux peuvent être réalisés pour estimer les paramètres de pollinisation. On définit F comme étant la production de graines d'une fleur ayant reçu les traitements suivants : I = fleur intacte ; E = émasculée ; S = pollinisation manuelle avec de l'autopollen (S pour « *self-pollen* ») ; X = pollinisation manuelle avec de l'allopollen issu d'un individu différent mais appartenant au même patch (X pour « *xenogamous pollen* »); dans un environnement de pollinisation naturel (N) ou avec exclusion des insectes pollinisateurs (C pour « *caged* »).



Traitements de pollinisation nécessaires pour l'estimation des paramètres de pollinisation.

Adapté d'Eckert *et al.* 2010.

Cinq paramètres de pollinisation peuvent être calculés à partir de ces traitements:

- 1) La **limitation en transfert de pollen (PTL)** : permet d'estimer si la proportion de graines produite par l'action exclusive des pollinisateurs atteint celle produite lorsque la fleur est saturée en pollen
- 2) La **limitation en pollen (PL)** : permet d'estimer si la proportion de graines produite en condition naturelle atteint celle produite lorsque la fleur est saturée en pollen
- 3) L'**assurance de reproduction (RA)** : permet d'estimer si la proportion de graines produite par l'action exclusive des pollinisateurs atteint celle produite lorsque la fleur est en condition naturelle (évalue la part d'autofécondation dans la production de graines)
- 4) L'**autofécondité (AF)** : permet d'estimer si la proportion de graines produite par autofécondation spontanée atteint celle produite lorsque la fleur est saturée en pollen
- 5) L'**autocompatibilité (AC)** : permet d'estimer si la proportion de graines produite avec de l'autopollen est la même que celle produite avec de l'allopollen

$$PTL = 1 - \frac{F_{EN}}{F_{IX}}$$

$$PL = 1 - \frac{F_{IN}}{F_{IX}}$$

$$RA = 1 - \frac{F_{EN}}{F_{IN}}$$

$$AF = \frac{F_{IC}}{F_{IX}}$$

$$AC = 1 - \frac{F_{EXC}}{F_{ISC}}$$

Dans le cas où la limitation en pollinisateurs est modérée, il est possible que le phénotype allogame soit maintenu de façon à maximiser l'attractivité des pollinisateurs et l'allofécondation, malgré une réduction du succès reproducteur (Goodwillie *et al.*, 2005; Eckert *et al.*, 2010). Par exemple, dans le cas où le manque en pollinisateurs est dû à une compétition intra ou interspécifique, il peut être plus avantageux de maintenir un phénotype allogame afin d'augmenter la probabilité d'être visité.

Lorsque c'est l'abondance en plantes conspécifiques qui limite la reproduction, le succès reproducteur peut être augmenté par autogamie spontanée, mais également par autogamie facilitée et geitonogamie grâce à l'activité des pollinisateurs (Barrett & Case, 2006; Vaughton & Ramsey, 2010). L'autogamie facilitée et la geitonogamie peuvent contribuer dans ce cas à pallier le manque de partenaires sexuels (assurance de reproduction). La geitonogamie, mode de pollinisation particulièrement probable chez les espèces à floraison massive (Snow *et al.*, 1996), dépend du nombre de fleurs ouvertes simultanément sur chaque individu et du comportement des pollinisateurs (Harder & Barrett, 1995; Eckert, 2000; Karron *et al.*, 2004). L'autogamie facilitée correspond à de l'autofécondation provoquée par le comportement de l'insecte lorsqu'il visite la fleur. Certaines plantes dont les anthères sont à déhiscence poricide sont pollinisées par des insectes (des bourdons notamment) qui provoquent la libération du pollen par la vibration de certains muscles (« *buzz pollination* »). Ce comportement facilite la libération de pollen destiné à être transporté vers d'autres fleurs, mais également le dépôt d'autopollen au sein de la fleur visitée. L'attraction d'insectes pollinisateurs étant nécessaire pour assurer la geitonomie et l'autogamie facilitée, les pressions de sélection sur les traits floraux et le système de reproduction sont différentes de celles qui sont impliquées dans l'évolution de l'autogamie spontanée. L'association d'un régime d'autofécondation élevée et de phénotypes favorisant l'attraction des pollinisateurs est donc probable bien que peu documentée.

L'évolution des systèmes de reproduction dépendra également de la transmission des gènes de génération en génération et de la survie des individus issus d'autofécondation. D'une manière générale, les potentialités d'assurance de reproduction sont dépendantes de la survie des embryons autofécondés par rapport à celle des embryons allofécondés, et ce, jusqu'à la maturation des graines (Husband & Schemske, 1996), ainsi que de la survie des descendants issus d'autofécondation par rapport à celle des descendants issus d'allofécondation (Charlesworth & Charlesworth, 1987).

3.2 Forces sélectives et système de reproduction dans un contexte de limitation de la pollinisation

L'évolution des systèmes de reproduction est généralement dépendante de la force de facteurs sélectifs favorisant l'autofécondation (coût de la méiose et assurance de reproduction) par rapport à celle de facteurs favorisant l'allofécondation tels que la dépression de consanguinité, la perte de pollen et la perte de graines (Lloyd, 1992).

L'évolution de l'autofécondation est basée sur la transmission des gènes par les voies paternelles (pollen) et maternelles (graines). L'autofécondation possède un **avantage automatique** par rapport à l'allofécondation (Fisher, 1941). En effet, dans une population pratiquant l'allofécondation, les individus autogames transmettront trois copies de leurs génomes aux générations suivantes contre deux copies seulement pour les individus allogames en supposant que le nombre de grains de pollen produits soit supérieur au nombre d'ovules disponibles (« *Bateman's principle* »), et que tous les ovules soient fécondés, (figure 6). Le coût de la méiose permet aux espèces strictement autogames de posséder un avantage de 50 % (Jain, 1976; Uyenoyama *et al.*, 1993).

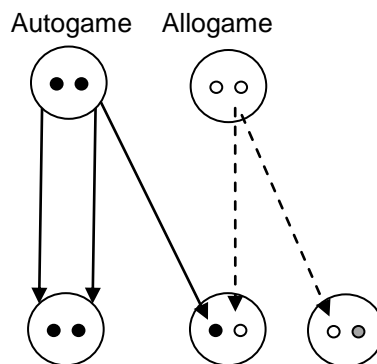


Figure 6. Le coût de l'allofécondation.

L'allèle d'autofécondation est représenté en cercle noir et l'allèle d'allofécondation en blanc. Les flèches représentent la transmission du parent aux descendants (flèche continue pour le génotype autogame et flèche en pointillé pour le génotype allogame). D'après Cheptou & Schoen, 2007.

Contrairement à ce qui est souvent avancé dans la littérature, lorsque la pollinisation est limitante, la probabilité de flux de gènes par fécondation croisée dans la population est réduite, diminuant ainsi l'avantage automatique des génotypes autogames (dans une perspective Fisherienne, voir Cheptou 2011). De plus, lorsque les pollinisateurs ou les

partenaires pour la reproduction sont rares, le succès reproducteur femelle des génotypes allogames sera réduit (Ward *et al.*, 2005) ainsi que leur succès reproducteur mâle (transfert de pollen réduit), paramètre pourtant peu pris en compte jusqu'alors (Cheptou, 2011).

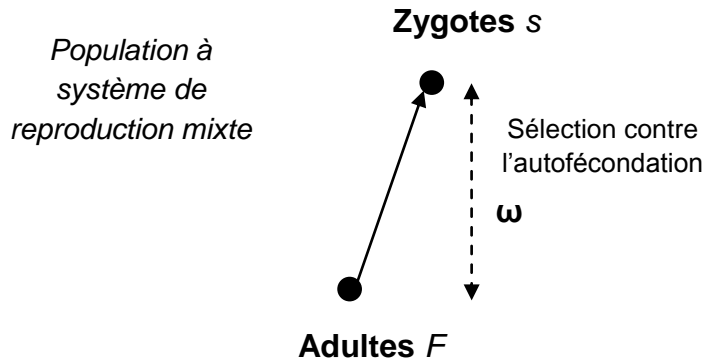
Une part importante dans l'étude de l'évolution de l'autofécondation consiste à évaluer les forces évolutives qui contrecarrent l'avantage automatique de l'autofécondation. Tout d'abord, la valeur sélective des individus issus d'autofécondation est réduite par la **dépression de consanguinité** (Charlesworth & Charlesworth, 1987). La dépression de consanguinité est définie le plus souvent par :

$$\delta = 1 - \frac{\omega_{auto}}{\omega_{allo}}$$

où ω_{auto} (ω_{allo}) est la valeur sélective des individus issus d'autofécondation (respectivement d'allofécondation). En théorie, la valeur de la dépression de consanguinité (δ) détermine l'évolution de l'autofécondation (Lloyd, 1979). Lorsque $\delta < 0.5$, le génotype autogame est favorisée et l'autogamie stricte est sélectionnée et inversement lorsque $\delta > 0.5$, l'allogamie stricte est sélectionnée (Nagylaki, 1976; Lloyd, 1979). Lorsque la pollinisation est limitante, une proportion $(1-e)$ d'ovules est fécondée et il reste une proportion e d'ovules non fécondés. Dans ce cas, l'autofécondation est sélectionnée si $\delta < 1 - e/2$ (Lloyd & Schoen, 1992).

Deux hypothèses non-exclusives reposant sur le fait que l'autofécondation augmente l'homozygotie d'une population peuvent expliquer une réduction de la valeur sélective des individus autogames : la superdominance et la dominance partielle (Lande & Schemske, 1985; Charlesworth *et al.*, 1990; Charlesworth *et al.*, 1991). Selon l'hypothèse de superdominance, la diminution de la valeur sélective est due au fait que l'hétérozygote (AB) a une valeur sélective supérieure aux deux homozygotes ($AA < AB > BB$). Selon l'hypothèse de dominance partielle, cette diminution est due à des mutations délétères récessives (a) qui seraient masquées à l'état hétérozygote mais s'exprimeraient à l'état homozygote ($AA \approx Aa \gg aa$) (Charlesworth & Charlesworth, 1987). La consanguinité permet alors dans ce cas de contre-sélectionner les mutations délétères (purge) (Byers & Waller, 1999; Johnston *et al.*, 2009, voir cependant Ronfort & Couvet, 1995).

Encadré 2. Mesure de la dépression de consanguinité basée sur les changements de coefficient de consanguinité



La dépression de consanguinité (δ) en population naturelle peut être estimée à partir de la consanguinité parentale (F , le déficit en hétérozygote) et du taux d'autofécondation s estimé dans les descendances (Ritland, 1990a; voir aussi Goodwillie *et al.*, 2005). Cette estimation permet d'appréhender la force de δ entre la production de graines et la maturité des individus adultes. Les variations possibles de δ selon les conditions environnementales rencontrées au cours du développement sont ainsi incluses dans cette estimation. En l'absence de δ , le coefficient de consanguinité des individus matures à l'équilibre est $F_e = s / (2 - s)$. La dépression de consanguinité réduit F à :

$F_e = s \omega_s / (2 - 2s + s \omega_s)$, où ω_s est la valeur sélective des descendants issus d'autofécondation en comparaison à la valeur sélective des descendants issus d'allofécondation qui est de 1 (en d'autres termes, $\omega_s = 1 - \delta$). La dépression de consanguinité peut alors être estimée par:

$$\delta = 1 - 2 \left[\frac{(1 - s)F}{s(1 - F)} \right]$$

Les conditions requises pour cette estimation sont que la consanguinité dans les populations soit à l'équilibre; que l'autofécondation soit la seule forme de croisement consanguin; que les marqueurs polymorphes utilisés soient neutres et non physiquement liés à des loci déterminant la valeur sélective.

La dépression de consanguinité est vue comme un processus dynamique, évoluant de concert avec l'autofécondation (Charlesworth *et al.*, 1990) et pouvant varier selon les conditions environnementales (Cheptou & Schoen, 2002; Cheptou & Donohue, 2010). Malgré le modèle théorique de Lande & Schemske (1985) prédisant que seules l'allofécondation complète ou l'autofécondation complète sont à l'état stable dans la nature, la distribution des systèmes de reproduction parmi les angiospermes est toute autre (Goodwillie *et al.*, 2005). En effet, 42% des espèces d'angiospermes pour lesquelles les taux d'autofécondation ont été documentés ont un système de reproduction mixte (entre 20 et 80% d'autofécondation). Particulièrement, lorsque la pollinisation est limitante pour la reproduction sexuée, contexte qui nous intéresse ici, la dépression de consanguinité ne pourra pas empêcher la production de graines par autofécondation qui est dérivé du contexte écologique. L'association d'une forte dépression de consanguinité à des systèmes de reproduction mixte, voir avec de forts taux d'autofécondation, a été mise en évidence chez plusieurs modèles d'études (Eckert & Barrett, 1994; Ramsey & Vaughton, 1996; Kephart *et al.*, 1999; Herlihy & Eckert, 2002).

Deux autres facteurs viennent contrecarrer l'avantage automatique de l'autofécondation, il s'agit de la **perte de pollen** (*pollen discounting*) et de la **perte de graines** (*seed discounting*). La perte de pollen se produit lorsque le pollen impliqué dans l'autofécondation réduit les possibilités d'allofécondation au profit de descendants dont la valeur sélective pourra être réduite par la dépression de consanguinité (Nagylaki, 1976; Holsinger, 1991). De la même manière, la perte de graines (Llyod, 1992) correspond aux graines qui sont autofécondées au dépend de l'allofécondation. Celle-ci sera de forte amplitude notamment lorsque l'autofécondation a lieu avant toute opportunité de fécondation croisée (*prior selfing*) ou au même moment (*competing selfing*). Elle peut être évitée, cependant, si l'autopollinisation se produit après toutes opportunités d'allofécondation (*delayed selfing*). La geitonogamie est un cas de figure typique entraînant une perte de pollen et de graines totale puisque le pollen collecté et déposé au sein du même individu génétique est théoriquement disponible pour la fécondation croisée (Ushimaru & Kikuzawa, 1999; Eckert, 2000). Les coûts associés à la perte de gamètes seront réduits voir annulés lorsque la pollinisation est limitante (Llyod, 1992; Herlihy & Eckert, 2002).

Le système de reproduction réalisé est la conséquence proximale du contexte écologique intégrant les patrons spatiaux des populations et des communautés ainsi que l'assemblage et le comportement de pollinisateurs, des caractéristiques florales et des filtres sélectifs postpollinisation (figure 7). Les conséquences ultimes (évolution du système de reproduction,

structuration génétique des populations, flux de gènes) dépendent du système de reproduction réalisé, mais également de la dépression de consanguinité, qui filtre les descendants issus d'autofécondation. Ainsi, selon la force de la dépression de consanguinité, la consanguinité à l'échelle de la population de plantes matures peut ne pas correspondre à la consanguinité des descendants (Goodwillie *et al.* 2005 ; encadré 3). Selon la survie des individus issus d'autofécondation et le contexte de pollinisation, les traits floraux favorisant l'autofécondation spontanée seront sélectionnés (flèche en pointillée ; figure 7) ce qui influencera par rétroaction la quantité relative d'auto et d'allopollen déposée sur les stigmates.

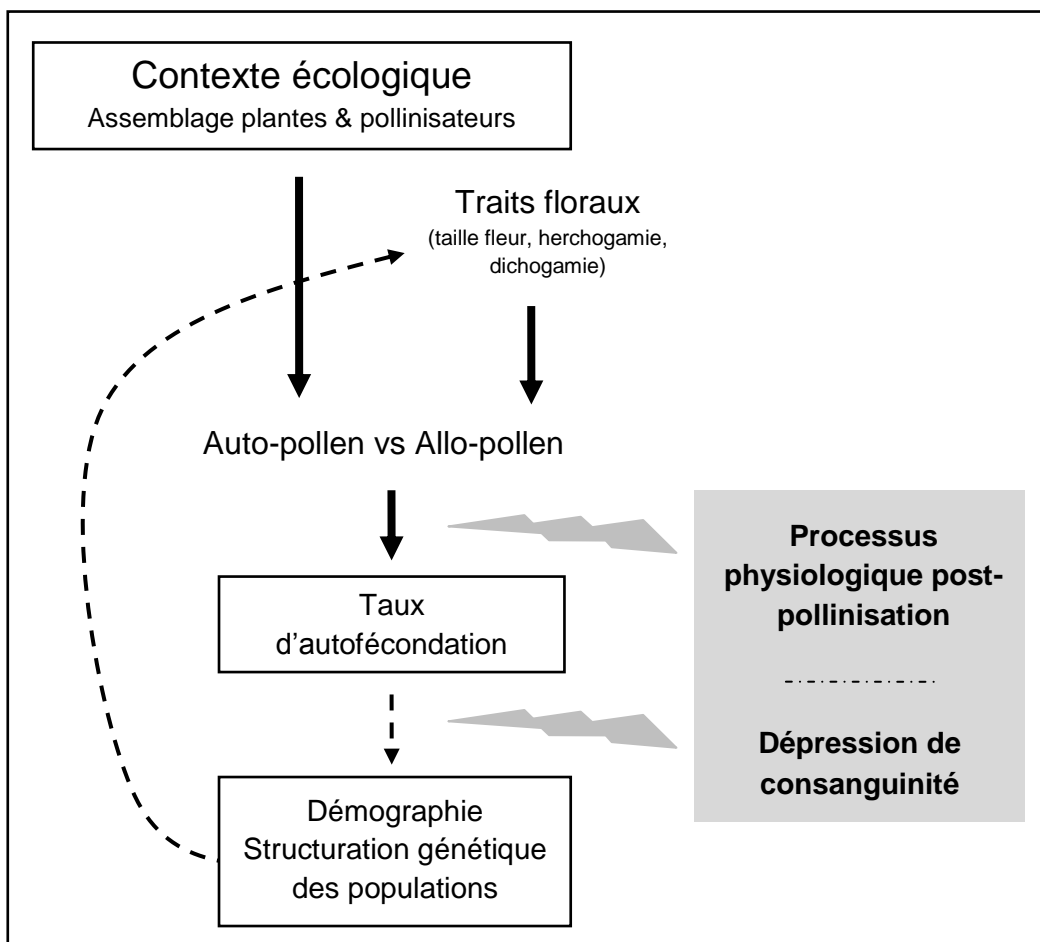


Figure 7. Schéma récapitulatif des conséquences proximales (flèches en trait plein) et ultimes (flèches discontinues) du contexte écologique sur le système de reproduction.

3.3 Interactions positives entre espèces

À l'échelle de la communauté, les interactions positives entre plantes peuvent permettre de compenser la limitation en pollinisateurs lorsqu'elles prennent le pas sur la compétition (Geber & Moeller, 2006). Par exemple, dans le cas de petites populations de faible densité, un partage des pollinisateurs avec les espèces cofleurissantes peut permettre de maintenir l'abondance et la diversité des pollinisateurs ainsi que le taux de visites de la plante cible (une forme d'effet Allee à l'échelle de la communauté, Rathcke, 1983). La facilitation prend donc le pas sur la compétition lorsque la présence d'une espèce ou d'une communauté de plantes va permettre d'augmenter indirectement, par le biais des pollinisateurs, le succès reproducteur de l'espèce étudiée (Ghazoul, 2006). L'équilibre entre les interactions de compétition et celles de facilitation au sein des communautés dépend donc de la balance entre l'augmentation du taux de visites et l'augmentation du flux de pollen hétérospécifique. Le partage des pollinisateurs en espèces cofleurissantes est souvent sous-estimé bien que l'ensemble des espèces de plantes et de pollinisateurs d'une communauté soient le plus souvent généralistes (Waser, 1996; Johnson & Steiner, 2000; Palmer *et al.*, 2003).

Par exemple, une communauté à forte richesse spécifique offre en théorie une plus grande diversité de ressources et de niches écologiques permettant l'attraction, la cohabitation et le maintien d'un grand nombre d'espèces de pollinisateurs (Lazaro *et al.*, 2009). Au sein d'une communauté riche en espèces, la facilitation peut donc permettre d'augmenter le succès reproducteur de l'espèce cible (Gross *et al.*, 2000). Plus particulièrement, il a récemment été mis en évidence que la limitation en pollen d'une plante cible (*Lasthenia fremontii*) peut diminuer avec la diminution de la distance phylogénétique entre cette espèce cible et les espèces cofleurissantes (Sargent *et al.*, 2011). Les relations phylogénétiques au sein d'une communauté pourraient donc jouer un rôle prépondérant dans les interactions de facilitation entre plantes par le biais des pollinisateurs (Sargent & Ackerly, 2008).

La limite entre la facilitation et la compétition au sein des communautés devrait donc être dépendante des caractéristiques propres à chaque partenaire de l'interaction ainsi que des caractéristiques de la population de la communauté et de l'habitat (figure 4). La biodiversité pourrait dans certains cas permettre de compenser l'isolement des individus et des populations d'une espèce cible grâce au partage des pollinisateurs.

4. OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'objectif principal de ce travail est de tester l'existence d'une limitation en transfert de pollen chez une espèce autocompatible à floraison massive (*Rhododendron ferrugineum*) en habitat fragmenté. Si celle-ci est avérée, il s'agit d'explorer les causes et les conséquences de cette limitation, ainsi que les mécanismes, intrinsèques à l'espèce cible ou liés à la communauté environnante, susceptibles de la compenser. L'identification des facteurs causant une limitation en transfert de pollen et la compréhension de leurs conséquences sur les systèmes de reproduction nécessitent une approche à l'échelle des communautés, cela afin de prendre en compte le rôle des interactions plantes-plantes et plantes-pollinisateurs dans le transfert de pollen conspécifique et hétérospécifique.

Les espèces à floraison massive offrent une opportunité particulière pour l'étude des interactions plantes-pollinisateurs et de la reproduction en habitat fragmenté. La production massive de fleurs permet certes une attraction importante des pollinisateurs, mais elle implique également de nombreux coûts au travers d'une compétition intraspécifique intense pour le service des pollinisateurs et d'une forte probabilité de flux de pollen intra-individu (geitonogamie). À l'échelle de la communauté, la présence d'espèces à floraison massive peut jouer un rôle clé dans le réseau d'interactions et offre de nouvelles perspectives dans la compréhension des patrons d'interactions plantes-pollinisateurs. Nous avons choisi d'utiliser les landes à *Rhododendron ferrugineum* (Pyrénées, France), qui se sont confirmées comme un modèle d'étude approprié par leur structuration spatiale et leur contexte floristique contrasté de l'une à l'autre.

Nos recherches vont donc porter dans un premier temps sur l'étude des interactions plantes-pollinisateurs à l'échelle de la communauté le long d'un gradient de taille, densité et d'isolement de patches de lande à rhododendron. En considérant les variations potentielles d'interactions plantes-pollinisateurs à l'échelle de la communauté, nous serons en mesure d'identifier les processus sous-jacents déterminant la quantité et la qualité des visites reçues par notre espèce cible. Dans un second temps, nous nous intéresserons aux impacts des variations de contexte écologique (distribution spatiale des plantes et des pollinisateurs) sur la pollinisation et le système de reproduction de *R. ferrugineum*. Dans cette perspective, nous estimerons dans chaque situation écologique le degré de limitation de la pollinisation (limitation en pollinisateurs *versus* en partenaires pour la reproduction) à l'aide de l'étude des

charges polliniques transportées et déposées par les pollinisateurs et de différentes manipulations florales (émasculation et pollinisation manuelle). Nous estimerons également le système de reproduction (autocompatibilité, traits floraux, taux d'allofécondation) et les mécanismes susceptibles de compenser cette limitation (assurance de reproduction, autofécondation). Une analyse de la dépression de consanguinité en population naturelle sera réalisée afin d'étudier les conséquences évolutives à long terme de la limitation de la pollinisation. Enfin, nous nous intéresserons aux caractéristiques de la communauté environnante (richesse spécifique, densité florale et relations phylogénétiques) et à leurs conséquences sur les interactions plantes-pollinisateurs de la communauté ainsi que sur la pollinisation et la reproduction de l'espèce cible selon la distribution spatiale de celle-ci.

5. CADRE DE L'ÉTUDE

5.1 Les landes à Rhododendron

Rhododendron ferrugineum L. (Ericaceae), arbuste sempervirent à longue durée de vie (pouvant atteindre 300 ans au moins), domine et structure des landes à éricacées sur les versants nord à nord-ouest de l'étage subalpin (1400 m-2200 m) des Pyrénées, des Alpes, du Jura et des Apennins. Ces landes à *R. ferrugineum* sont donc constituées **d'arbustes de rhododendron** en plus ou moins grande densité et d'une communauté riche en plantes entomogames, appelée ici **communauté environnante**. La floraison de cette espèce est spectaculaire dans les paysages montagnards, l'arbuste produisant en moyenne 300 inflorescences de 5 à 22 fleurs de couleur rose-rouge par m² (encadré 3). La croissance et la floraison débutent simultanément environ 15 jours après la fonte des neiges et se déroulent sur à peine plus d'un mois lorsque les conditions climatiques lui sont favorables (entre fin mai et début août selon les altitudes).

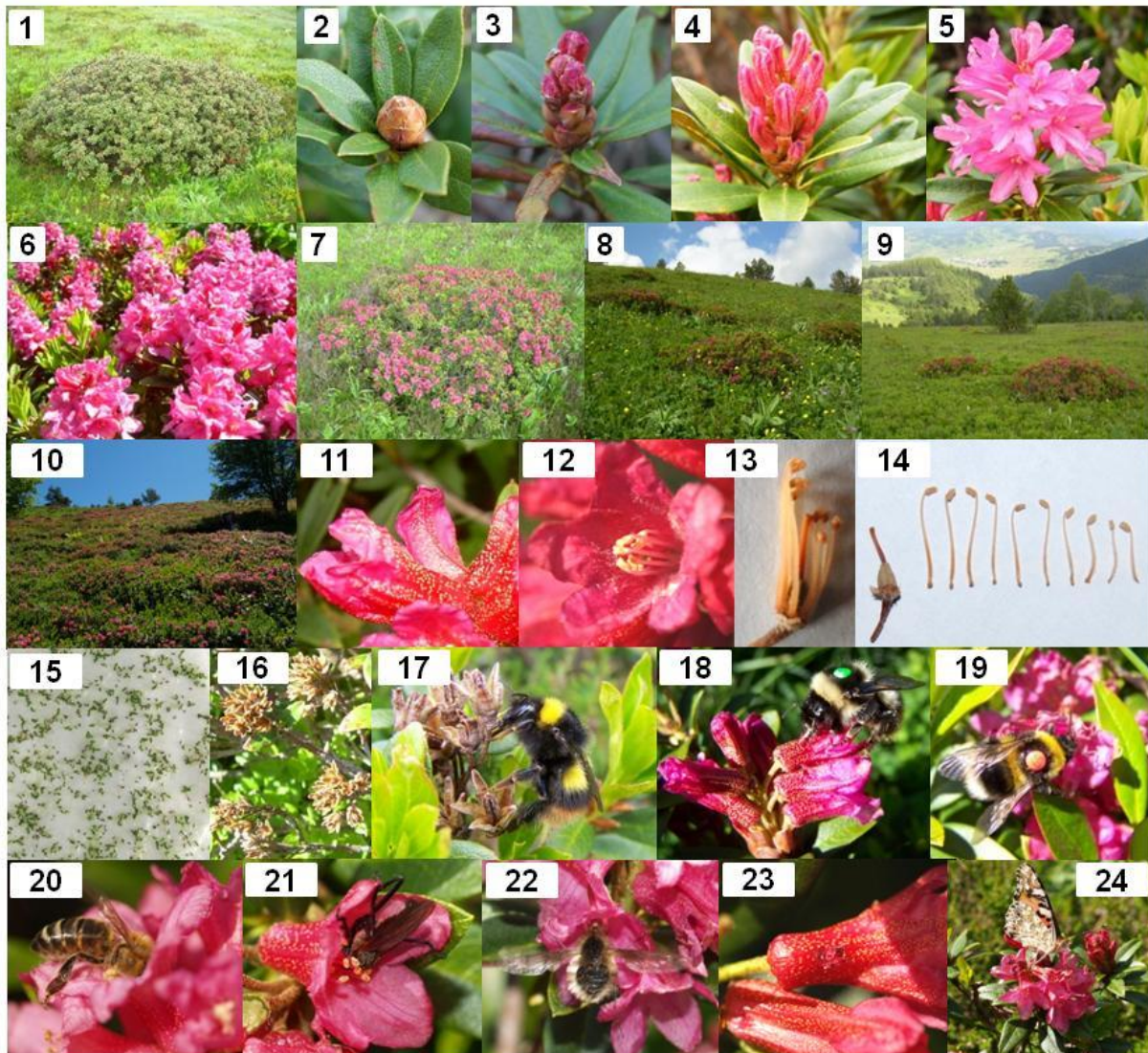
Rhododendron ferrugineum se reproduit grâce à deux modes : la reproduction asexuée (marcottage), processus qui a été étudié dans les Alpes et les Pyrénées lors de précédents travaux (Pornon *et al.*, 1997; Escaravage *et al.*, 1998; Pornon *et al.*, 2000) et auquel je m'intéresserai peu ; et la reproduction sexuée qui a été décrite sur des populations alpines (Escaravage *et al.*, 1997). Les bourgeons inflorescentiels sont mis en place l'année précédant la maturation permettant ainsi à cette espèce de fleurir rapidement après la fonte des neiges. Les fleurs sont pentamères légèrement zygomorphes, nectarifères et protandres (les anthères sont matures avant le stigmate). C'est une espèce autocompatible et l'autofécondation spontanée est possible bien que, nous le verrons, une dépression de consanguinité précoce limite l'autofécondation comme précédemment mis en évidence chez d'autres espèces d'Ericaceae (Rathcke & Real, 1993; Hokanson & Hancock, 2000; Nuortila *et al.*, 2002; Raspe *et al.*, 2004). Une étude de la morphologie florale a mis en évidence l'existence de deux types d'étamines : de petites étamines sous ou au même niveau que le style qui sont responsables de l'autofécondation spontanée et de longues étamines arrivant au-dessus du style (Escaravage *et al.*, 2001). Les étamines sont réparties sur deux verticilles (cinq étamines par verticille) avec les étamines longues et courtes sur les verticilles intérieurs et extérieurs, respectivement. La

déhiscence des étamines se fait par des pores⁹ et la libération du pollen est particulièrement facilitée par les insectes faisant vibrer leurs muscles de vol indirect et provoquant la libération du pollen. Ce mode de pollinisation se nomme « *buzz pollination* » en référence aux sons produits par les vibrations de l'insecte. En effet, *R. ferrugineum* est une espèce entomophile, pollinisée principalement par des hyménoptères (abeilles et bourdons) bien que de nombreux insectes visitent ses fleurs, sans pour autant être des vecteurs de pollen efficaces (lépidoptères, coléoptères, fourmis et abeilles sauvages chez les hyménoptères, mouches, empidides et volucelles chez les diptères ; Escaravage & Wagner, 2004).

Les graines, dispersées lors de la déhiscence des fruits vers début septembre ont une forme oblongue de 1 à 2 mm. Le potentiel reproducteur est très important (reproduction végétative et production de nombreuses graines), mais l'effort reproducteur en termes de masse de graines est limité (3-21 g/m² de biomasse de graines, Pornon *et al.*, 1997). La production d'une multitude de petites graines est un caractère commun au genre *Rhododendron* (Sprecht, 1996) et permet d'assurer l'installation d'individus dès que le contexte (biotique et abiotique) le permet. La croissance des plants est lente (1 cm en fin de première saison), ce qui les rend sensibles à la compétition, au stress hydrique, à la reptation de la neige et à l'herbivorie (Pornon *et al.*, 1997).

La communauté environnante des landes à rhododendron est riche de plus de 80 espèces de plantes entomophiles (principalement des herbacées) sur le site d'étude. Avant la période de floraison de *R. ferrugineum* (mai et début juin), la communauté est dominée par *Anemona nemorosa*, *Narcissus poeticus*, *Ranunculus carinthiacus* et *Vaccinium myrtillus*, la seconde espèce d'Ericacée structurant les landes. Pendant la floraison de *R. ferrugineum* (de mi-juin à mi-juillet), cette communauté est dominée par *Cardamine pratensis*, *Conopodium majus*, *Lotus corniculatus*, *Polygala calcarea*, *Potentilla erecta* et *Ranunculus acris*. *Chamaespartium sagitalis*, *Gentiana lutea*, *Helianthemum nummularium* et *Thymus serpyllum* dominent la communauté environnante après la période de floraison de *R. ferrugineum*.

⁹ Les anthères de 6 à 8 % des espèces d'angiospermes sont à déhiscence poricides ce qui restreint la collecte de pollen par les insectes (Buchmann, 1983)

Encadré 3. *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae)

(1) Arbuste avant la floraison; (2) Bourgeon inflorescentiel; (3) Débourrement du bourgeon; (4) Inflorescence prête à s'épanouir; (5) Inflorescence épanouie : petite grappe de fleurs raccourcie en corymbe; (6) Floraison massive; (7) Arbuste en pleine floraison; (8) et (9) Patches de lande « fragmentés »; (10) Patch de lande « non fragmenté »; (11) Corolle déversée, un peu irrégulière, recouverte de petits tubercules clairs glanduleux et détachables qui couvrent aussi densément le pédoncule floral; (12) Corolle avec 5 pétales d'abord soudés en tube qui ensuite se libèrent et s'écartent. Intérieurement, la corolle est velue; (13) et (14) Les pièces fertiles mâles sont composées de 5 étamines longues et de 5 étamines courtes. Elles s'ouvrent par des pores au sommet. Le pistil rassemble 5 carpelles soudés. L'ovaire est surmonté d'un style rouge, coiffé d'un stigmate brun/blanc, plat à 5 papilles. Les glandes nectarifères se trouvent à la base de l'ovaire; (15) Plantules (cotylédons, quelques mm); (16) Les fruits sont des capsules brunes s'ouvrant par 5 valves qui portent les graines sur les bords; (17) *Bombus pratorum santoniae* (Hymenoptera) posé sur les fruits de l'année passée; (18) *Bombus wurfleini* perce les corolles pour récolter le nectar; (19) Pollinisation par *Bombus ruderatus*; (20) *Apis mellifera* (Hymenoptera); (21) *Empis tessellata* (Diptera); (22) *Bombylius* sp. (Diptera); (23) Corolle percée ; (24) *Cynthia cardui* (Lepidoptera).

5.2 Site d'étude

5.2.1 Au pays de Sault

Les milieux montagnards sont connus pour leurs conditions climatiques contraignantes et très hétérogènes ayant pour conséquence de réduire la diversité et de contraindre l'activité des pollinisateurs (Mani, 1962; Cruden, 1972; Arroyo *et al.*, 1985). Cependant il a été montré que les Pyrénées abritent une très grande diversité d'hyménoptères, particulièrement en bourdons (Iserbyt *et al.*, 2008), pollinisateurs principaux de *R. ferrugineum* sur notre zone d'étude. Lors de notre étude répartie sur une centaine d'hectares, pour 100 insectes collectés plus de 15 espèces de *Bombus spp.* ont été identifiés (voir annexe 2).

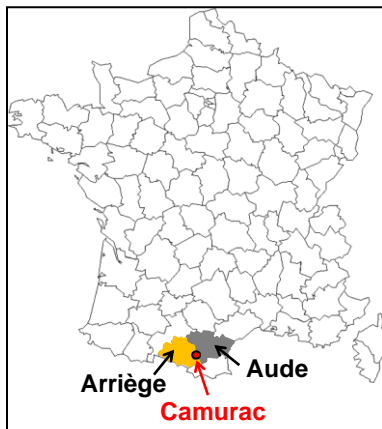


Figure 8. Localisation du site d'étude.

Cette étude a été réalisée durant les saisons de végétation 2009 et 2010 (de mai à juillet) sur un site de 3 km² aux confins des Pyrénées audoises et ariégeoises (« Pays de Sault », France) à proximité du village de Camurac (42°46'31"N 01°55'45"E ; figure 8). L'intégralité des patchs de lande à rhododendron se trouvant sur la zone d'étude a été sélectionnée et suivie pendant ces deux années (n = 28 patchs). L'altitude varie peu entre les patchs de lande (1550 m à 1750 m). Les températures journalières moyennes au cours de la période d'expérimentation (mai-juillet) sont comprises entre 6,2 et 21,2 °C (enregistrement semi-horaire en 2009 grâce à des capteurs HOBO, Hobo® Data Loggers).

5.2.2 Le gradient de structuration spatiale étudié

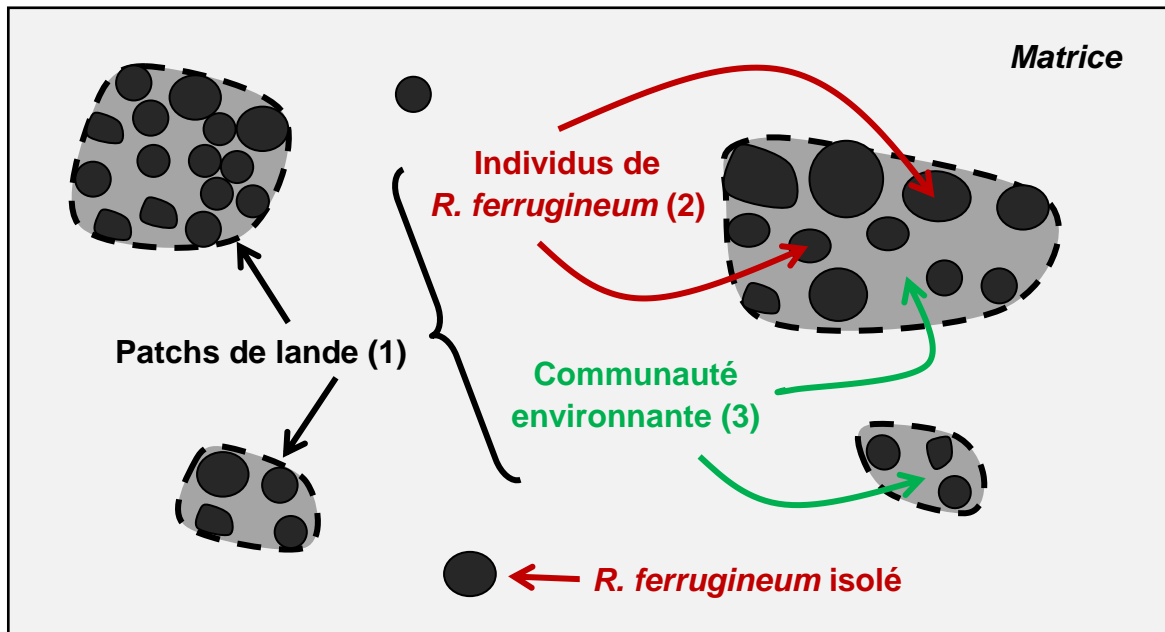


Figure 9. Schéma représentatif des patches de lande à rhododendron sur notre site d'étude.

Un **patch de lande à *Rhododendron ferrugineum*** (1, figure 9) est constitué d'individus de **rhododendron** (2) et d'une **communauté environnante** (3) riche en plantes entomogames. Un patch est caractérisé par un regroupement de rhododendrons (minimum 3 individus) visuellement individualisable du patch le plus proche (la plus petite distance entre 2 patches étant comprise entre 41m et 165m dans notre zone d'étude). La surface des patches varie de 0,01 à 15,77 ha. Il est important de noter qu'il n'y a aucune barrière « physique » empêchant le déplacement des pollinisateurs entre les plantes du patch (rhododendron et communauté environnante) et celles situées entre les patches.

Les patrons spatiaux des patches de lande à *R. ferrugineum* observés sont très contrastés allant de grands patches principalement occupés par le rhododendron à de petits patches dans lesquels la communauté environnante occupe la majeure partie de l'espace (**gradient de fragmentation locale**). Le gradient de fragmentation locale est dû à un pâturage intensif non homogène dans la zone d'étudiée ainsi que des broyages et brûlis d'individus voir de patches entiers réalisés par les éleveurs de moyenne montagne. Les patrons observés le long du gradient de fragmentation locale nous ont permis d'étudier, en population naturelle, les conséquences de la distribution spatiale d'une plante dominant la communauté sur les interactions plantes-pollinisateurs et le système de reproduction de notre espèce cible. Les

études réalisées sur de petites échelles spatiales (locales) se sont montrées pertinentes pour comprendre les déplacements et le comportement des pollinisateurs, particulièrement les bourdons.

Nous avons décrit ce gradient à l'aide de différentes mesures caractérisant la distribution spatiale de *R. ferrugineum* à l'échelle du patch et à l'échelle de l'individu. Pour cela, nous avons sélectionné aléatoirement 4 individus de *R. ferrugineum* dans chacun des 28 patches (tous les individus lorsque leur nombre était inférieur à 4 ; $n = 109$ individus). Les observations de taux de visites, les tests de pollinisation et l'analyse du système de reproduction ont été effectuées sur ces 109 individus. Afin de décrire le patron spatial de chaque lande, nous avons quantifié :

1. Le **nombre total d'inflorescences de chacun des 109 individus**
2. Le degré d'**isolement de chaque individu** (m ; médiane de la distance aux trois plus proches voisins)
3. Le **recouvrement du rhododendron** au sein de chaque patch (m^2 ; au sein d'une parcelle de $400 m^2$ délimitée aléatoirement au sein du patch) ; le **recouvrement de la communauté environnante** étant égale à $1 - \text{recouvrement du rhododendron}$.
4. La **densité d'inflorescences** de *R. ferrugineum* au sein de chaque patch ($/ 400 m^2$)
5. La **surface** de chaque patch (m^2 ; estimée d'après les points GPS relevés sur le contour de chaque patch)
6. La **ressource florale totale de *R. ferrugineum*** au sein de chaque patch : nombre total d'inflorescences dans chaque patch (estimation à partir des variables 4, 5 et 6).
7. Le degré d'**isolement de chaque patch de lande** (m ; médiane de la distance aux trois patches les plus proches)

Les caractéristiques de la communauté environnante (richesse spécifique et densité florale par exemple) ne sont pas utilisées pour la description de ces patrons spatiaux. Selon les articles ci-après et contraint par les demandes des *reviewers*, deux approches différentes ont été utilisées pour tester l'effet du gradient de fragmentation locale sur les différentes variables étudiées (présentées en Annexe 3). Toutefois, ces deux méthodes aboutissent aux mêmes résultats et conclusions : l'effet du gradient de fragmentation locale sur les variables réponses considérées dans chaque article étant identique avec l'une ou l'autre des approches.

Une approche multivariée (ACP) a été utilisée afin d'obtenir des variables synthétiques caractérisant le contexte écologique de chaque patch (distribution spatiale de

R. ferrugineum). Pour cela, les variables 1, 2, 4, 6 et 7 ont été utilisées ; les variables 3 et 5 étant incluses dans l'estimation de la variable 6 (voir chapitre 2). Cette approche permet de représenter la variation de l'ensemble des variables mesurées à l'échelle du patch ainsi que le degré d'isolement de chaque individu.

Les variables 1, 2, 4 et 6 étant fortement corrélées (tableau 2), elles rendent compte d'une même réalité biologique, soit une fragmentation locale croissante allant de petits patches épars à faible ressource florale de rhododendron à de grands patches de densité et de ressource florale de rhododendron importantes. A moins d'utiliser une approche multivariée (ACP), l'utilisation de la totalité des variables mesurées n'est donc pas utile lorsque ce sont les variables « brutes » qui sont utilisées (chapitres 1, 4 et 5 et annexe 1). Nous avons donc sélectionné deux des variables mesurées : l'isolement des patches et la ressource florale totale de *R. ferrugineum* au sein de chaque patch (variable 6 et 7, respectivement). La ressource florale totale de *R. ferrugineum* a été sélectionnée car il s'agit de la variable la plus intégrative à l'échelle du patch. Dans la discussion générale de mon travail de thèse, j'ai choisi dans un souci de clarté de considérer seulement cette dernière approche.

Tableau 2. Matrice de corrélation de Pearson entre les variables de cartographie.

	Iso. ind. (2)	Densité inflo. / patch (4)	Ressource florale /patch (6)	Iso. Patch (7)
Nb inflo. ind. (1)	-0.8 < 0.0001	0.85 < 0.0001	0.76 < 0.0001	0.52 0.0046
Iso. ind. (2)		-0.9 < 0.0001	-0.88 < 0.0001	- 0.18 0.3623
Densité inflo. par patch (4)			0.93 < 0.0001	0.24 0.2118
Ressource florale par patch (6)				0.14 0.4798

Pour chaque corrélation sont indiqués le coefficient de Pearson (valeur du haut) et la valeur de *P* (valeur du bas). Les valeurs en gras indiquent la significativité ($P < 0.05$). Les variables ont été transformées en LOG après un test de la normalité des résidus du modèle. Abréviations : Nb, nombre ; Inflo., inflorescences ; Ind., individu ; Iso., isolement. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux numéros attribués à chaque variable (ci-dessus).

5.2.3 Étude des caractéristiques de la communauté environnante

Afin d'évaluer le rôle des caractéristiques de la communauté environnante (densité florale [ressource florale normalisée par la surface au sol], richesse spécifique et relations phylogénétiques¹⁰) dans les interactions plantes-pollinisateurs de la communauté totale, nous avons décrit l'assemblage de plantes cofleurissantes au sein des patches de lande avec notre espèce modèle en 2009 et en 2010. Les plantes de la végétation environnante (*R. ferrugineum* exclu) ont été déterminées (famille, genre, espèce) tout au long de la floraison de l'espèce cible. Le contexte floristique de chaque patch a été étudié à l'aide de 20 quadrats (1 m x 1 m) placés aléatoirement dans la végétation environnante (*R. ferrugineum* exclu) le long de transects quadrillant la lande. Chaque quadrat a été photographié (vue de dessus) et le nombre de fleurs épanouies de chaque espèce par quadrat a été quantifié lors de l'analyse visuelle de chaque photo. La méthode a préalablement été validée sur un sous échantillonnage de 20 quadrats pour lesquels nous avons identifié et compté le nombre de fleurs épanouies par espèce sur le terrain, puis sur la photographie. Chaque espèce ayant été déterminée *in situ*, seule l'identification à l'échelle de certaines espèces (genre *Ranunculus* et *Veronica* par exemple) a pu porter à confusion. Dans le cas où nous n'avons pas pu identifier l'espèce sur la photographie, seul le nom de genre a été utilisé. Un nombre moyen de fleurs épanouies par inflorescence a été déterminé *in situ* pour les espèces inflorescentielles (exemple : *Ajuga reptans*) et un nombre de fleurs moyen par rameau pour les espèces à ramification et à densité florale trop importante (exemple : *Genista pilosa*). Les résultats concernant le rôle des caractéristiques de la communauté environnante dans les interactions plantes-pollinisateurs seront discutés dans la troisième partie de la discussion générale.

¹⁰ Les méthodes des analyses phylogénétiques sont présentées dans le « matériels et méthodes » de l'annexe 1.

CHAPITRE 1

Effects of patch floral display and isolation on community
visitor assemblage and pollen transfer limitation in
Rhododendron ferrugineum (Ericaceae)

Effects of patch floral display and isolation on community visitor assemblage and pollen transfer limitation in *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae)

Chloé E.L. Delmas^{1,2*}, Nathalie Escaravage^{1,2}, André Pornon^{1,2}

¹ *Université de Toulouse, ENFA; UMR 5174 EDB (Laboratoire Évolution & Diversité Biologique); 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France*

² *CNRS, Université Paul Sabatier; UMR 5174 EDB, F-31062 Toulouse, France*

* *For correspondence. E-mail: chloedelmas@gmail.com*

(Soumis)

ABSTRACT

Background and aims. Plant community patterns may have major impacts on plant-pollinator interactions. Yet, these impacts are poorly understood, especially in self-compatible species for which low pollinator and/or conspecific plant availability may have various ecological and evolutionary consequences on the evolution of mating system. We investigated the impact of the spatial pattern of a mass-flowering dominant plant species on plant-pollinator interactions in *Rhododendron* heathlands and pollen transfer limitation in *R. ferrugineum*. **Methods.** We assessed the impact of heathland patch isolation and *R. ferrugineum* floral display and cover within patches on visitor assemblages of the total heathland community (*Rhododendron* and surrounding community). We then evaluated whether changes in visitor assemblages at a community scale were accompanied by changes in *Rhododendron* flower visitation rate and pollen transfer limitation (PTL; comparing seed set from emasculated versus pollen-supplemented flowers). **Key results.** *R. ferrugineum* floral display was positively related to Hymenoptera diversity in *Rhododendron* and to Hymenoptera abundance in the total heathland community. However, *Rhododendron* visitor density and flower visitation rate decreased with increasing *R. ferrugineum* floral display and we found disproportionate relative visitor abundance in *Rhododendron* compared to the surrounding community. There was no evidence for a relationship between PTL and floral display while PTL decreased with increasing patch isolation. **Conclusions.** Therefore, changes in visitor assemblages and visitation rate with floral display size do not always result in changes in pollinator services. Our results suggest that the attractiveness of the mass-flowering strategy of *R. ferrugineum* may compensate for reduced conspecific plant availability in small sparse patches resulting in a similar level of PTL along the *R. ferrugineum* floral display gradient.

Key words: Community; mass-flowering species; plant spatial pattern; pollen transfer; pollination; *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae); self-compatible; visitation rate.

INTRODUCTION

Plant-pollinator interactions are essential for the continued functioning of most terrestrial ecosystems (Ollerton *et al.*, 2006). Yet, they suffer from a currently changing world possibly leading to a global biodiversity decline (Loreau *et al.*, 2001, Biesmeijer *et al.*, 2006). Fragmentation of natural vegetation is one of the most pervasive changes in terrestrial ecosystems that disrupt plant-pollinator interactions (Rathcke and Jules, 1993, Kearns *et al.*, 1998). Recent meta-analyses (Aguilar *et al.*, 2006) reported that on average, a decrease of size and an increase of isolation of plant populations resulting from habitat fragmentation can locally reduce the reproductive success of plants. This reduction has been attributed both to a decrease in pollen quantity, through a decrease in pollinator availability (Aizen and Feinsinger, 1994a, Aizen and Feinsinger, 2003) and a decrease in pollen quality, due to decreased availability of compatible mates (Cunningham, 2000, Duncan *et al.*, 2004, Aizen and Harder, 2007). At local scales, several studies have shown that the efficiency of conspecific pollen transfer is driven by taxon-specific foraging behavior of pollinators (Schmitt, 1980) and local plant population and community patterns that determine the diversity, the availability and the activity of the pollinators involved (Diekotter *et al.*, 2007, Cosacov *et al.*, 2008). However, a community perspective has too seldom been addressed to understand plant spatial pattern effects on pollination interactions (Geber and Moeller, 2006).

First, patch and population spatial attributes such as size, density, floral display and isolation affect conspecific plant availability (Wagenius, 2006, Campbell and Husband, 2007), behavior of pollinators within and between patches and consequently, the level of pollination failure and plant fitness (Lennartsson, 2002, Cheptou and Avendano, 2006). Small, sparse and isolated plant patches with small floral display sizes may provide too few mates and little attraction or reward for pollinators (Kunin, 1997, Dauber *et al.*, 2010) leading to a reduction in the quantity and quality of pollination services (Wilcock and Neiland, 2002). Second, conspecific pollen transfer also depends on the surrounding flowering environment (heterospecific co-flowering plants) of the focal species (Duncan *et al.*, 2004, Lazaro *et al.*, 2009, Sargent *et al.*, 2011) and the structure and heterogeneity of the entire community (Vamosi *et al.*, 2006, Sargent and Ackerly, 2008). In most situations, pollinators respond to plants according to their relative frequency (purity), reflecting the abundance of individuals relative to those belonging to other species (Ghazoul, 2005). The surrounding plant community may have facilitative effects on the frequency of pollinator visits to the target plant (Moeller, 2004, Ghazoul, 2006) by supporting resident pollinator populations (Duffy

and Stout, 2008) and promoting pollinator movement between patches (Albrecht *et al.*, 2009). This may enhance gene flow and hamper the negative effect of isolation. The surrounding community may also dramatically reduce effective pollination of the target plant through pollinator sharing by decreasing the frequency of pollinator visits and increasing interspecific pollen transfer (reviewed by (Morales and Traveset, 2008, Mitchell *et al.*, 2009). Investigating community spatial pattern effects on pollinator community and pollination services (i.e. pollen transfer) could be a key step towards a better understanding of the impact of anthropogenic disturbances on plant-pollinator interactions and plant reproduction.

Self-compatible hermaphroditic species are known to be less sensitive to pollination failure caused by reduced plant mate availability and/or pollinator availability than self-incompatible ones (Ashman *et al.*, 2004, Knight *et al.*, 2005). In such species, pollen limitation (plant reproduction limited by pollen receipt) can be mitigated by autonomous self-pollination which can sometimes provide reproductive assurance (Morgan and Wilson, 2005, Kennedy and Elle, 2008, Zhang and Li, 2008). However, the magnitude of failure of pollen transfer by pollinators and its origin (mate versus pollinator limitation) may determine the evolutionary responses of plant mating system (Eckert *et al.*, 2010, Cheptou, 2011). To assess pollinator services for species capable of selfing, typical measures of pollen limitation (comparing unmanipulated flowers vs. pollen-supplemented flowers) are not optimal and the seed set from emasculated flowers should be compared to the seed set from cross-pollen-supplemented flowers (Kalisz *et al.*, 2004). Emasculated flowers provide insights into the actual pollen delivery by pollinators. When supplemented flowers set more seeds than emasculated flowers, pollination services provided exclusively by pollinators might be insufficient to produce a full seed set.

Here we investigate the impact of plant spatial pattern on plant-pollinator interactions in *Rhododendron ferrugineum* heathlands. Heathland communities, dominated and structured by the shrub *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae), are widely and patchily distributed between 1400 and 2300 m a.s.l. in the Alps and the Pyrenees (Europe) (Ozenda, 1985). Because of their high ecological value, this natural heritage of flora must be locally preserved (COM, 1992). The size and isolation of heathland patches in subalpine meadows and the within-patch coverage of *R. ferrugineum* versus surrounding community are highly variable. Heathland patch spatial patterns mainly result from heterogeneous age-long burning and livestock grazing, decreasing the coverage of the focal species within patches and increasing the distance between patches in meadow. We characterize plant spatial pattern of each heathland patch by estimating the proportional cover of *R. ferrugineum* versus surrounding

community, *R. ferrugineum* floral display within patches and heathland patch isolation. Patches ranged from large and dense patches with a high proportion of area covered by the focal species to sparse patches with isolated *Rhododendron* individuals in large surrounding flowering community.

Our aim was to understand how spatial pattern of plants dominant in their communities affects pollination interactions and to detect a pollinator-mediated effect on subsequent pollen transfer for the focal mass-flowering and self-compatible species *R. ferrugineum*. First, we described pollinator assemblages for *R. ferrugineum* and its surrounding community in terms of diversity, abundance, density and pollinator preferences between rhododendron and surrounding community. Second, we evaluated whether the changes in pollinator assemblages along the spatial pattern gradient was accompanied by changes in *R. ferrugineum* flower visitation rate and pollen transfer limitation (PTL).

MATERIALS AND METHODS

Study species

Rhododendron ferrugineum is an evergreen shrub with well branched trailing stems of 0.7-0.8 m height. Its massive floral display consists of numerous inflorescences of 5-22 bright red nectariferous tubular flowers and reaches in average more than 800 inflorescences per individual (Escaravage *et al.*, 1997, Pornon *et al.*, 1997). This species is protandrous and reproduces both sexually (mixed mating system) and vegetatively through layering. Spontaneous self-fertilization (without the intervention of pollinators) occurs as evidenced by bagged inflorescences naturally self-pollinated (Escaravage *et al.*, 1997). The flowering period of a population lasts for 20-30 days. Flowers last about 10 days and are initiated the year before they mature (Escaravage *et al.*, 1997). In a previous study, Escaravage and Wagner (2004) showed that the most efficient pollinators of *R. ferrugineum* are honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus sp.*) while Diptera (Muscid and Syrphid flies and Empididae), Lepidoptera and Coleoptera were secondary pollinators.

The surrounding community associated to *R. ferrugineum* within heathland patches is composed of about eighty co-flowering entomophilous species across the study site and is dominated by *Cardamine pratensis*, *Conopodium majus*, *Lotus corniculatus*, *Polygala calcarea*, *Potentilla erecta* and *Ranunculus acris*. Before *R. ferrugineum* flowering period, heathlands are dominated by *Anemona nemorosa*, *Narcissus poeticus*, *Ranunculus carinthiacus* and *Vaccinium myrtillus*, the second species structuring heathland patches.

Chamaespartium sagitalis, *Gentiana lutea*, *Helianthemum nummularium* and *Thymus serpyllum* dominated the community after *R. ferrugineum* flowering period.

Study site

The study was conducted on a 3 km² area in the French Central Pyrenees (southern France), near the village of Camurac (42°46'31"N 01°55'45"E). Altitudes range from 1550 m to 1750 m a.s.l. and the snow cover usually lasts from late October until May. The heathland communities studied were spatially distributed into visually distinct patches (i.e., aggregation of *R. ferrugineum* embedded in their associated flowering community and separated from other patches by meadow). We selected all the heathland patches (n = 28) found in the 3 km² area. There were no other *R. ferrugineum* populations surrounding this area.

Heathland spatial pattern

To describe plant spatial pattern of heathland patches, we first measured patch isolation as the median distance between each target patch and its three nearest patches. Patch isolation ranged from 50m to 378m (mean of 137m). Second, we estimated the total area (m²) covered by *Rhododendron* versus the surrounding community within each patch. *R. ferrugineum* coverage per patch was estimated from (i) the area occupied by the focal shrub in a 400m² plot haphazardly placed at the patch core and (ii) the total surface of each heathland patch (m²). Total patch area was obtained from geographic coordinates of patch perimeters recorded every 5 meters and analyzed in OziExplorer (GPS mapping software, version 3.95.4m, Des Newman). The total area (m²) covered by the surrounding community within each patch was one minus *R. ferrugineum* coverage. Third, we estimated the total *R. ferrugineum* floral display within each heathland patch as the product of the mean density of inflorescences per m² assessed from a 0.25 x 0.25m plot placed on 20 haphazardly chosen individuals per patch and the total area (m²) covered by *Rhododendron* within each patch.

R. ferrugineum floral display characterized the within patch plant spatial distribution as it includes its proportional coverage within heathland patches. Increasing *R. ferrugineum* floral display corresponded to a decrease in the coverage of the surrounding community. Within heathland patches, the proportion of *R. ferrugineum* coverage ranged from 0.18% to 98% (the coverage of the surrounding community ranged from 2% to 99.82%). Heathland patch areas ranged from 0.01 to 15.77 ha (1.73 ± 0.38 ha). Overall, floral display ranged from 170 to 33,567,317 rhododendron inflorescences (mean: 2,529,257).

Surveys of visitor assemblages

We conducted standardized surveys of flower-visiting insects to estimate the diversity and abundance of visitors foraging in each heathland patch. The observations were conducted during the entire *R. ferrugineum* flowering season (4 June to 30 June 2009) in the morning (10:00 – 14:00 hours) and in the afternoon (14:00 – 18:00 hours) when relatively sunny and clear conditions favored pollinator activity. Each patch was surveyed twice over the sampling period at least a week apart. Days and hours (morning versus afternoon) of sampling were random across patches for the first sampling round. For the second round, we performed the survey in the morning if it was done in the afternoon during the first round and vice versa due to potential temporal differences in pollinator activity. During each sampling period, one person slowly walked for 15 min along a 50 x 2 m transect (total sampling time of 840 minutes) haphazardly placed at the patch core (to avoid edge effect) and recorded all visitors to flowers of any species occurring in the transect as they come.

We assessed *R. ferrugineum* and surrounding community visitor abundances by the mean number of insect visits per patch to *R. ferrugineum* and flowers from the surrounding community, respectively. The abundance of visitors in the total heathland community was assessed by the sum of *R. ferrugineum* and surrounding community visitor abundances. We calculated the relative abundance of *R. ferrugineum* visitors per patch as the number of visits observed on *R. ferrugineum* flowers divided by the number of visits to the total heathland community. In order to take into account the non-homogeneous proportion of *R. ferrugineum* across heathland patches and infer potential pollination services, we calculated the density of *R. ferrugineum* visitors by dividing the abundance of *R. ferrugineum* visitors by the proportion of *R. ferrugineum* coverage per patch (COV). The same method was applied to obtain the density of visitors in the surrounding community (dividing the abundance of surrounding community visitors by 1-COV).

To assess the diversity of Hymenoptera visitors to *R. ferrugineum*, surrounding community and total heathland community, we used a conservative estimate of diversity (mean number of taxa per patch) by classifying flower-visiting Hymenoptera in 12 taxa: honey bees (*Apis mellifera*), halictid bees (*Lasioglossum sp.*) and 10 bumblebees taxa (*Bombus sp.*) using the color patterns proposed by Rasmont (1999) for Pyrenean bumblebees because several species cannot be discriminated in situ due to homochromy (Delmas, 1976). Insect visitors that did not enter in the corolla of *R. ferrugineum* or other co-flowering species were not included in the census (no foraging behavior). Since, we were not able to

differentiate the different species from the Coleoptera, Diptera and Lepidoptera families during transect-walk, we did not focus on their diversity. Finally, we collected 121 visitors of *R. ferrugineum* flowers at the end of the pollen limitation experimentation for further species identification and identified 14 bumblebee species foraging on *R. ferrugineum* (Supplementary Data Table S1, available online).

Rhododendron ferrugineum pollen transfer limitation (PTL)

To assess PTL, we randomly chose four individuals per patch (three patches had only three individuals; total sample size of 109 individuals). We performed two pollination treatments replicated twice on each target individual: emasculation and supplementation of outcross pollen. Flowers from two haphazardly selected inflorescences were emasculated by excising the anthers prior to anthesis to preclude self-pollen deposition and left open to insect visits. An emasculated flower sets seeds only if it has received conspecific pollen from a pollinator. A previous experiment characterizing *R. ferrugineum* breeding system showed that the seed set of emasculated flowers was not significantly different from the seed set of unmanipulated flowers (Escaravage *et al.*, 1997) suggesting that emasculations are unlikely to alter pollinator attraction in *R. ferrugineum*. Outcross-pollen supplementations were carried out every other day on flowers from two haphazardly selected intact inflorescences with pollen collected from a distant individual in the same patch.

In August 2009, fruits were harvested just before dehiscence to ensure the full development of the seeds. Two fruits per manipulated inflorescence were randomly selected, dissected under the stereomicroscope and filled seeds were counted. We then calculated the mean number of seeds per treatment per individual. As counting the number of aborted seeds is not possible in *R. ferrugineum* because of their size (less than 1mm and non differentiable from small pieces of the dissected fruit), we quantified the mean number of ovules per ovary by collecting 2 inflorescence buds per target individual before blooming and preserved them in 70% alcohol. Two flowers from each inflorescence bud were dissected under a stereomicroscope and the ovules were counted. We calculated a mean seed set per treatment and per individual by dividing the mean number of mature seeds by the mean number of ovules. For each individual, mean seed set obtained in each treatment was used to calculate a pollen transfer limitation index expressed as: $PTL = 1 - (E/S)$, where E is the mean seed set of emasculated flowers left open to natural pollination and S the mean seed set of flowers that received supplementary cross pollen (Kalisz *et al.*, 2004). $PTL = 0$ indicates that conspecific

pollen deposition by pollinators was not a limiting factor in seed production. The final data set included 84 individuals (on the 109 manipulated individuals) from 26 patches due to weather, animal or human deteriorations of inflorescences. We calculated a mean PTL per patch by averaging PTL from individuals from the same heathland patch.

Rhododendron ferrugineum visitation rates

To test the impact of *R. ferrugineum* floral display and isolation on the frequency of visits received by *R. ferrugineum* flowers, we recorded on 105 individuals (among the 109 used for PTL estimation) the number of visits during two replicate 10-min observation periods from 4 June to 30 June 2009 (1760 minutes). A visitation rate per flower per 10 min was obtained by dividing the number of visits by the total number of flowers on each individual. Total flower number of each individual was obtained by multiplying the total number of inflorescences by 10.8 ± 0.38 (mean \pm SE of flower number per inflorescence assessed on 120 haphazardly chosen inflorescences from different individuals in the study site). We obtained a mean flower visitation rate per patch by averaging visitation rates of individuals from the same heathland patch.

Statistical analyses

Multiple linear regressions were used (PROC REG, SAS Software package version 9.1, SAS Institute 2003) to analyze the effects of patch isolation and *R. ferrugineum* floral display on i) Hymenoptera diversity for the total heathland community, *R. ferrugineum* and surrounding community, ii) visitor abundance in the total heathland community, iii) visitor density in *R. ferrugineum* and surrounding community, iv) flower visitation rate and v) PTL.

The analyses on flower visitor response variables were performed on the overall assemblage and on each order (Hymenoptera, Diptera and Lepidoptera) separately. Since Coleoptera visits were too rare, we were not able to test the effect of heathland spatial pattern on the abundance and density of these insects.

We used Chi-square statistics to test the preference of visitors for *R. ferrugineum* versus surrounding community flowers within each heathland patch. A preference may be observed when *R. ferrugineum* (or surrounding community) attracted a disproportionate fraction of visitors relative to its coverage in the total heathland community. Alternatively, in the case of no visitor preference, we expected the proportion of visits to *R. ferrugineum* to be fairly equal to its proportional coverage within patches.

Model residuals were tested for adherence to a normal distribution and homogeneity of variances, and response variables were square-root (count data) or log-transformed prior to analysis when necessary. *R. ferrugineum* floral display and patch isolation were not correlated (Pearson r correlation coefficient = 0.14, P = 0.48).

RESULTS

Flower-visitor assemblages

Overall, 1,328 visits to the total heathland community (including *R. ferrugineum* and the surrounding flowers) were recorded during transect-walks, Hymenoptera and Diptera being the most abundant visitors (Figure 1). Overall, three times more visits were recorded to *R. ferrugineum* (991 visits) than to the surrounding community (337 visits).

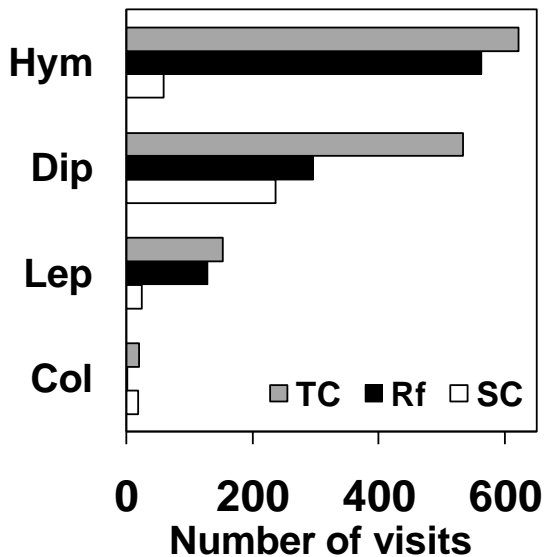


Figure 1. Visitor assemblages of heathland communities. The number of visits is the total number of flower visitors recorded in the total heathland community (TC, grey bars), in *R. ferrugineum* (Rf, black bars) and in the surrounding community (SC; open bars). Hym: Hymenoptera; Dip: Diptera; Lep: Lepidoptera; Col: Coleoptera.

The most abundant taxon visiting the surrounding community was Diptera (70% of visits) while the least abundant were Lepidoptera and Coleoptera (Figure 1). Hymenoptera visits to the surrounding community (17.5%) were made mainly by halictid bees, honey bees and bumblebees of *Lapidarius*, *Pyrenes* and *Terrestris* bumblebee color patterns (see Methods) foraging mainly on *Anthyllis vulneraria*, *Genista pilosa*, *Lathyrus montanus*, *Lotus corniculatus* and *Polygonum bistorta*. The most abundant taxa visiting *R. ferrugineum* were Hymenoptera and Diptera (Figure 1). Hymenoptera were mainly represented by bumblebees (77.1% of Hymenoptera visits). Among the ten bumblebee color patterns, *terrestris* was the most abundant. Four taxa (*gerstaeckeri*, *hortorum*, *hypnorum* and *vestalis* color patterns) were exclusively observed on *R. ferrugineum*, whereas the six others were observed foraging on

both *R. ferrugineum* and surrounding community flowers. Hymenoptera visitor diversity (conservative estimate) was higher for *R. ferrugineum* (2.14 ± 0.19 taxa) than for the surrounding community (0.56 ± 0.09 , paired t-test: $t_{27} = 7.30$, $P < 0.0001$).

Patch spatial pattern impact on visitor assemblages

Patch spatial pattern (*R. ferrugineum* floral display and patch isolation) emerged as a good predictor of visitor assemblages in heathland community as it explained 22 to 77% of the variability of half of the response variables (whole model; Table 1). More specifically, *R. ferrugineum* floral display was the best predictor of visitor assemblage response variables. In contrast, few pollinator variables were significantly affected by heathland patch isolation (Table 1).

Table 1. Multiple linear regression models of pollinator diversity, abundance and density relations to *R. ferrugineum* floral display per patch and patch isolation.

Response variable	Type of visit	<i>R. ferrugineum</i> FD		Patch isolation		Overall model	
		Partial R ²	<i>P</i>	Partial R ²	<i>P</i>	<i>R</i> ²	<i>P</i>
Hymenoptera diversity	TC	0.13	0.06	0.005	0.73	0.13	0.17
	Rf	0.22 (+)	0.01	0.009	0.63	0.22	0.04
	SC	0.002	0.80	0.07	0.17	0.07	0.38
Overall visitor abundance	TC	0.30 (+)	0.003	0.07	0.19	0.36	0.04
Hymenoptera abundance	TC	0.59 (+)	<0.0001	0.03	0.38	0.60	<0.0001
Diptera abundance	TC	0.04	0.33	0.001	0.86	0.04	0.61
Lepidoptera abundance	TC	0.09	0.12	0.002	0.85	0.09	0.29
Overall visitor density	Rf	0.76 (-)	<0.0001	0.07	0.18	0.77	<0.0001
	SC	0.20 (+)	0.02	0.40 (+)	0.0004	0.51	0.0001
Hymenoptera density	Rf	0.22 (-)	0.01	0.19 (-)	0.02	0.34	0.006
	SC	0.07	0.18	0.02	0.44	0.09	0.30
Diptera density	Rf	0.74 (-)	<0.0001	0.006	0.71	0.74	<0.0001
	SC	0.11	0.09	0.08	0.15	0.17	0.09
Lepidoptera density	Rf	0.13	0.06	0.0008	0.89	0.13	0.16
	SC	0.026	0.42	0.05	0.27	0.07	0.39

Abbreviations: FD: floral display; TC: total community; Rf: *R. ferrugineum*; SC: surrounding community. Bold values: Significant variables ($P < 0.05$). Trends are shown in parentheses.

The diversity of Hymenoptera foraging either in the total heathland community or in the surrounding community was not significantly related to *R. ferrugineum* floral display (Table 1). However, the diversity of Hymenoptera foraging on *R. ferrugineum* flowers increased significantly with increasing *R. ferrugineum* floral display (Table 1).

We found a significant positive relationship between *R. ferrugineum* floral display and the abundance of overall visitors and Hymenoptera visitors in the total heathland community while neither Diptera nor Lepidoptera abundance were significantly affected (Table 1).

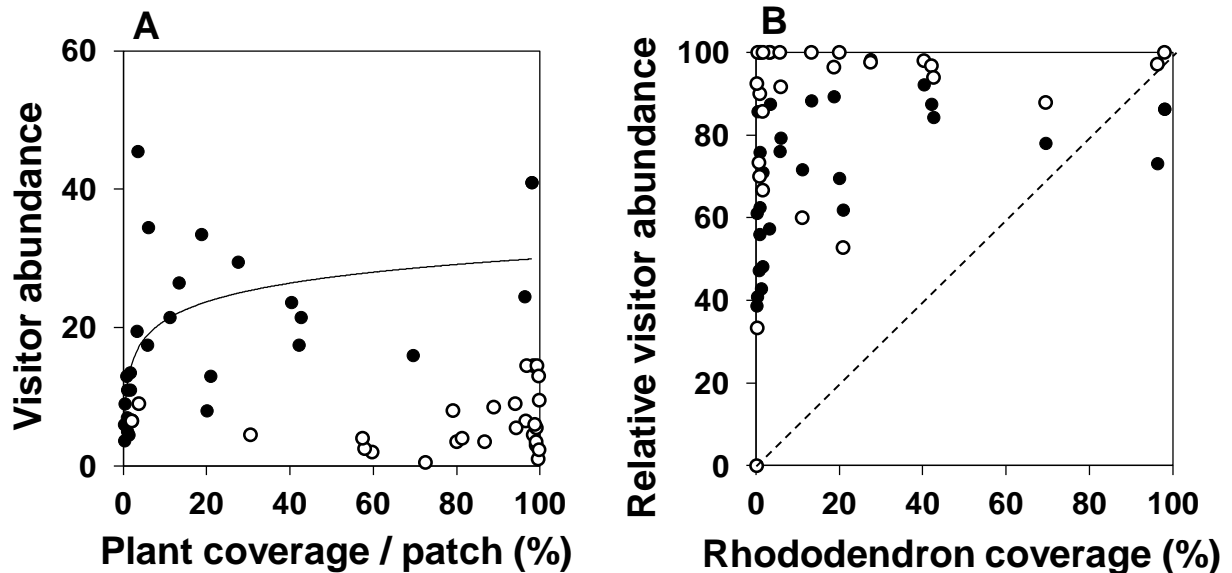


Figure 2. (A) Relation of *R. ferrugineum* (full circles) and surrounding community (open circles) overall visitor abundance to percentage of plant coverage per patch (*Rhododendron* and surrounding community, respectively). Significant relationship is presented in full line (see text for details). (B) Relation of relative *R. ferrugineum* visitor abundance (%) to percentage of *R. ferrugineum* cover per patch ($n = 28$, ranging from 0.18 % and 98 %). Black dots: Overall abundance. Open dots: Hymenoptera abundance. Above the dotted line, proportional visitation to *R. ferrugineum* is higher than the *R. ferrugineum* proportion cover.

Overall abundance of *R. ferrugineum* visitors was positively but not linearly related to the proportion of *R. ferrugineum* coverage per patch (Figure 2A, regression: $R^2 = 0.38$, $P = 0.0005$, $y = 3.5947\ln(x) + 12.021$) showing the increase in visitor abundance as an accelerating function at low *R. ferrugineum* coverage (up to 10 % of coverage) and the saturation of visitors as *R. ferrugineum* coverage increased. Overall abundance of visitors in the surrounding community was not significantly related to its proportion within patches (Figure 2A, linear regression: $R^2 = 0.02$, $P = 0.43$). Moreover, *R. ferrugineum* attracted a disproportionate fraction of visitors relative to its coverage in heathland patches. Even with cover as low as 5%, more than 40% of the overall visitors were found to forage on the focal species and in 19 patches out of 28, more than 90% of Hymenoptera were recorded on *R. ferrugineum* (Figure 2B). Chi-squared analysis strongly supported the biased distribution

of visitors in the community to the benefit of *R. ferrugineum* ($X^2 = 403.5$, $k = 27$, $P < 0.001$ and $X^2 = 213.3$, $k = 27$, $P < 0.001$ for overall visitors and Hymenoptera visitors respectively).

Consequently, the overall visitor density (number of visitors standardized by the proportion of *R. ferrugineum* coverage per patch; Figure 3) as well as the density of Hymenoptera, and Diptera visitors to *R. ferrugineum* significantly increased with decreasing *R. ferrugineum* floral display (Table 1). The relationship between visitor abundance and *R. ferrugineum* coverage per patch (the two variables used in the calculation of visitor density) ensured the robustness of the increase in visitor density (see above). In contrast, the overall visitor density in the surrounding community (Figure 3, Table 1) significantly increased with increasing *R. ferrugineum* floral display. The relationship between visitor abundance and surrounding community coverage per patch (see above) supported the robustness of this result. Furthermore, heathland patch isolation was significantly and positively related to the overall density of visitors in the surrounding community and significantly and negatively related to the density of Hymenoptera visitors to *R. ferrugineum* (Table 1).

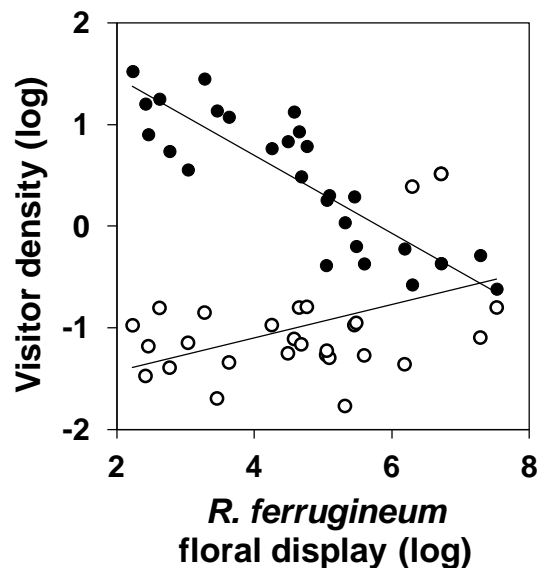


Figure 3. Relation of *R. ferrugineum* (full circles) and surrounding community (open circles) overall visitor density to *R. ferrugineum* floral display within patches. Visitor density is a mean number of visitors standardized by the coverage of *R. ferrugineum* (or surrounding community) per patch. Significant regressions are represented in full lines (see details in Table 1). Note visitor density is log transformed.

Patch spatial pattern impacts on R. ferrugineum visitation rates and pollen transfer limitation

Mean flower visitation rate (all visitors pooled) significantly decreased with increasing *R. ferrugineum* floral display and were not significantly affected by heathland patch isolation (Table 2). Among all taxa, only Diptera visitation rate significantly decreased with increasing floral display (Table 2).

Table 2. Multiple linear regression models of mean flower visitation rate and mean pollen transfer limitation relations to *R. ferrugineum* floral display per patch and patch isolation.

Response variable	<i>R. ferrugineum</i> FD		Patch isolation		Overall model	
	Partial R ²	<i>P</i>	Partial R ²	<i>P</i>	<i>R</i> ²	<i>P</i>
Overall VR	0.27 (-)	0.007	0.06	0.22	0.31	0.01
Hymenoptera VR	0.13	0.07	0.02	0.50	0.14	0.16
Diptera VR	0.27 (-)	0.007	0.01	0.59	0.28	0.02
Lepidoptera VR	0.009	0.64	0.04	0.30	0.05	0.53
PTL	0.05	0.29	0.26 (-)	0.01	0.31	0.01

Abbreviations: VR, visitation rate; PTL, pollen transfer limitation; FD, floral display. Bold values: Significant variables ($P < 0.05$). Trends are shown in parentheses.

We found a significantly lower seed set in emasculated flowers than in pollen-supplemented flowers (mean and standard error 0.45 ± 0.03 and 0.72 ± 0.03 respectively; paired t-test: $t = -9.49$, $P < 0.0001$, $n = 84$). Mean pollen transfer limitation (PTL) reached 0.34 ± 0.03 (34% reduction in seed set due to PTL). There was no evidence for a significant relationship between PTL and *R. ferrugineum* floral display while PTL decreased significantly with increasing heathland patch isolation (Table 2; Fig. 4A and B).

Finally, we found no significant relationship between flower visitation rate and PTL ($R^2 = 0.02$, $P = 0.48$).

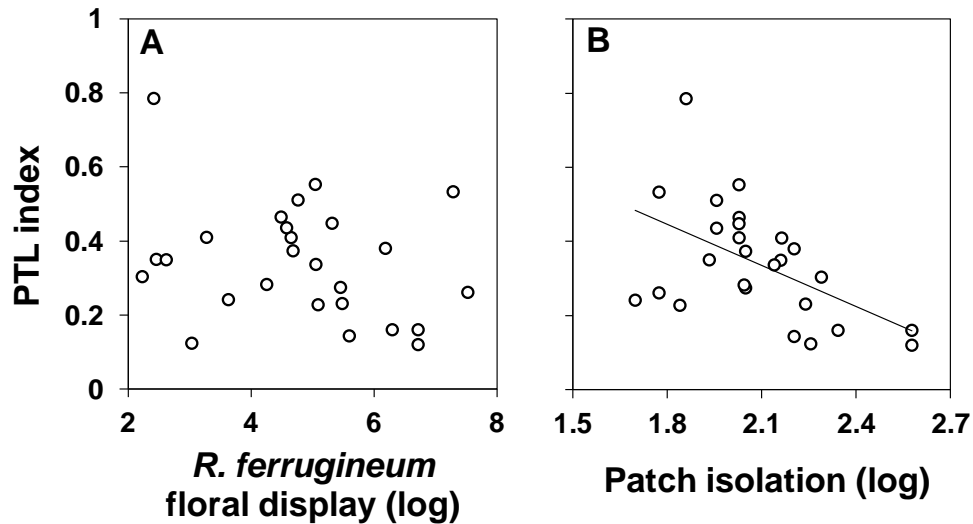


Figure 4. Relation of *R. ferrugineum* pollen transfer limitation (PTL index) to (A) *R. ferrugineum* floral display within patches and (B) patch isolation. $PTL = 1 - (\text{seed output from emasculated flower} / \text{seed output from supplemented flower})$. Significant relationship is presented in full line (see details in Table 2).

DISCUSSION

Heathland spatial pattern impact on visitor assemblages

Plant patch size, density, floral display size and the degree of isolation have been identified as key determinants of pollinator diversity, abundance and foraging behavior (Gonzalez-Varo *et al.*, 2009, Dauber *et al.*, 2010). We found that the diversity of *R. ferrugineum* Hymenoptera visitors increased with increasing *R. ferrugineum* floral display per patch, likely as a result of abundant rewards in large dense patches (Goulson *et al.*, 2008). More specifically, this relationship was mainly driven by the absence in small sparse patches of bumblebees recorded foraging on *R. ferrugineum* only (potential specialist insects). Specialist flower-visiting insects are putatively highly sensitive to the reduction of population size (Kunin, 1993). On the contrary, Hymenoptera diversity in the surrounding community was not affected albeit the broad variation in surrounding community coverage and the higher density of open flowers in larger surrounding community area within patches (Delmas *et al.* unpubl.). Hymenoptera rarely visited flowers from the surrounding community. It is worth noticing that Hymenoptera diversity could have been underestimated in this study since several *Bombus* species may be pooled in the same color pattern (taxon). Moreover, since the effect of pollinator diversity on plant fecundity has been shown to vary depending on the relationship between pollinator effectiveness and frequency of interaction (Perfectti *et al.*, 2009), the foraging behavior of

each pollinator species should be assessed in addition to demographic and community assessment.

We found a positive impact of increasing *R. ferrugineum* floral display on the abundance of visitors to the total heathland community. However, this impact concerned *R. ferrugineum*'s main pollinators, Hymenoptera and not the other visitors, Diptera and Lepidoptera (Escaravage and Wagner, 2004). Hymenoptera depend on both pollen and nectar for reproduction (larvae feeding) and feeding, and need to return to the nest between each foraging bout while Diptera and Lepidoptera only depend on direct feeding rewards and are independent of a nest location. Consequently, we hypothesized that heathland spatial pattern could impact more the abundance of Hymenoptera than that of other flower-visitors. The response of pollinators to plant spatial pattern is known to depend on plant patch characteristics such as temporal and spatial variation in resource supply (Hatfield and LeBuhn, 2007) and on the ecology and habitat requirements of each pollinator taxon (Aizen and Feinsinger, 1994b, Donaldson *et al.*, 2002). Moreover, the high visitor abundance in large and dense heathland patches could be explained by pollinator movements occurring preferentially from smaller patches to larger ones (Wagenius, 2006) although the reverse has sometimes been observed (Albrecht *et al.*, 2009).

A high conspecific floral density has been shown to increase patch attractiveness to pollinators, flower visitation rate (especially by bumblebees) and plant reproductive output, i.e. the Allee effect (Rathcke, 1983, Kunin, 1997, Cheptou and Avendano, 2006). However the relationship can become negative when flower number increases faster than the number of pollinators, thereby counterbalancing the benefit of mutual attraction of many conspecifics (Campbell and Husband, 2007, Spigler and Chang, 2008). Here, the abundance of *R. ferrugineum* visitors first increased with *R. ferrugineum* coverage (from 0.18 to 10%) and quickly saturated as the coverage of the focal species increased higher than 10% within patches. Despite the accelerating response of visitors at low plant coverage, our results indicated a decrease in the density of Hymenoptera and Diptera foraging on *R. ferrugineum* and a decrease of the mean flower visitation rate with increasing *R. ferrugineum* floral display. Moreover, *R. ferrugineum* attracted a disproportionately large fraction of visitors relative to its coverage in the community. Visitors were strongly aggregated on a few mass-flowering individuals in small and sparse heathland patches and were widely diluted in large and dense patches. Few studies have found such a negative relationship between patch size and insect visitation rate (but see (Campbell and Husband, 2007, Lopes and Buzato, 2007, Wagenius and Lyon, 2010)). However, the data reported often failed to explain the increase in

pollinator visitation in fragmented areas (Wagenius and Lyon, 2010). The strong preference of insects for *R. ferrugineum* in the community may result from its mass-flowering habit with high conspicuousness in the background vegetation and large floral resources for foraging insects. Indeed, a large target plant contrasting with its backdrop can be more easily detected by pollinators with a searching strategy involving visual cues (Spaethe *et al.*, 2001).

Since the abundance of visitors was similar in large and small surrounding community areas, visitor density in the surrounding community increased with increasing *R. ferrugineum* floral display, following the opposite trend than visitor density in *R. ferrugineum*. This pattern could be due to the dilution of visitors over large surrounding community area at low *R. ferrugineum* floral display and to an aggregation of visitors in small surrounding community area at high *R. ferrugineum* floral display. However, the latter is not likely since flower visitors can leave heathland patches to forage in meadows around patches. The explanation of the low density of surrounding community visitors in small sparse heathland patches could also be related to the high visitor density in *R. ferrugineum*. Indeed, this mass-flowering species could have a strong sink effect on surrounding community visitors. However, such a sink effect would increase with increasing *R. ferrugineum* floral display (reducing the density of surrounding community visitors in large dense patches) which was not observed. The surrounding community could be an important source of insects for *R. ferrugineum* such as generalist bumblebees and dipterans and might be able to compensate for the negative impact of isolation on pollinator availability. Finally *R. ferrugineum* may act as a “magnet” species which attracts flower visitors to a particular patch, those visitors then spilling over to the surrounding community (Lavery, 1992).

Patch isolation had only a negative impact on the density of *R. ferrugineum* Hymenoptera visitors and a positive impact on the density of overall visitors in the surrounding community. An increase in patch isolation has been shown to reduce visitation rate, especially by Hymenoptera (Sih and Baltus, 1987) and may lead pollinators to forage in the surrounding community within and between patches (Kwak and Jennersten, 1991).

Heathland spatial pattern impact on pollen transfer limitation (PTL)

Surprisingly, our results showed that PTL was not affected by heathland spatial gradient despite the large variation of *R. ferrugineum* floral display. Overall, PTL was moderate and limited the seed set by 34 %. In large dense patches, this could result from an insufficient pollinator availability limiting the deposition of conspecific pollen on stigmas (intraspecific

competition for pollinator services). In small sparse patches, a low proportion of conspecific pollen deliver to flowers due to reduced conspecific plant availability (Wilcock and Neiland, 2002) and the lower *R. ferrugineum* Hymenoptera diversity may contribute to PTL. Pollinator diversity has been shown to have a strong impact on the reproductive output of other plant species (Donaldson *et al.*, 2002). Finally, in large dense patches as well as in small and sparse ones, pollinators may deliver pollen from related individuals or geitonogamous pollen that could reduce fitness if there is inbreeding depression (Byers, 1995, Aizen and Harder, 2007). Therefore, we hypothesize that the moderate level of PTL may be due to (i) a high proportion of conspecific pollen transferred by visitors reducing the impact of intraspecific competition in large dense patches and (ii) the aggregation of visitors on *R. ferrugineum* and increase of flower visitation rate counterbalancing the reduced mate availability in small sparse patches. Both hypotheses may contribute to maintain the same magnitude of PTL over the plant spatial pattern gradient.

Despite a lower visitor density recorded in isolated patches, PTL was significantly and negatively related to patch isolation possibly resulting from a higher conspecific pollen quantity carried by each insect as patch isolation increased (Delmas *et al.* unpubl.). Optimal foraging theory (Charnov, 1976) suggests that pollinators will forage more intensively in isolated patches to reduce the cost of travel time between distant patches. This could lead to lower PTL in isolated patches due to more conspecific pollen carried by pollinators and deposited on stigmas. Moreover, an increase of population isolation may sometimes influence pollinator foraging behavior enhancing pollen transfer between populations (Lowe *et al.*, 2005).

Finally, the effects of experimental emasculation on flower attractiveness and resource reallocation to flowers could have caused a higher seed set in pollen supplemented than in emasculated flowers (Zimmerman and Pyke, 1988, Knight *et al.*, 2006) and an overestimation of the PTL. However we do not expect that this potential bias could have generated artificial variation in PTL along the patch spatial gradient (de Jong *et al.*, 2005) given that the applied emasculation procedure was strictly the same for all manipulated individuals.

In conclusion, we evidenced that spatial pattern of a mass-flowering species is a key determinant for Hymenoptera diversity and abundance. Decreased diversity and/or abundance of visitors with reduced conspecific plant availability may not necessarily result in a decline of visitation rate and decrease in conspecific pollen transfer when the plant has floral traits allowing it to disproportionately attract pollinators. We found that the Allee effect was unlikely in our focal mass-flowering species for which flower visitation rate is driven by intra-specific

competition for pollinator services. The community approach used in this study allowed us to highlight the monopolization of pollinators by *R. ferrugineum* in the community, which may compensate for reduced plant availability in small sparse patches and may explain the similar level of PTL recorded along the *R. ferrugineum* floral display gradient.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary data are available online at aob.oxfordjournals.org and consist of the following. Tableau S1: List of flower-visiting insects of *Rhododendron ferrugineum*.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank P. Buscail, M. Ferval, and L. Verneuil for help with data collection. We thank Pr. P. Rasmont for carrying out insect identifications. We are also grateful to C. Andalo, P-O. Cheptou and E. Elle for helpful comments on an earlier draft of the manuscript. Many thanks to P. Winterton for editing the manuscript. This work is part of the "Laboratoire d'Excellence (LABEX)" entitled TULIP (ANR -10-LABX-41).

FUNDING INFORMATION

This work was supported by La Fondation Pour la Recherche sur la Biodiversité [COMBIO project N° AAP-IN-2009-013] and a French Ministry grant to CELD.

LITERATURE CITED

- Aguilar R, Ashworth L, Galetto L, Aizen MA. 2006.** Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters*, **9**: 968-980.
- Aizen MA, Feinsinger P. 1994a.** Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco dry forest, Argentina. *Ecology*, **75**: 330-351.
- Aizen MA, Feinsinger P. 1994b.** Habitat fragmentation, native insect pollinators, and feral honey bees in Argentine 'Chaco Serrano'. *Ecological Applications*, **4**: 378-392.
- Aizen MA, Feinsinger P. 2003.** Bees not to be? Responses of insect pollinator faunas and flower pollination to habitat fragmentation. In: Bradshaw GA, Marquet PA eds. *How landscapes change*. Berlin, Germany, Springer-Verlag.
- Aizen MA, Harder LD. 2007.** Expanding the limits of the pollen-limitation concept: Effects of pollen quantity and quality. *Ecology*, **88**: 271-281.
- Albrecht M, Duelli P, Obrist MK, Kleijn D, Schmid B. 2009.** Effective Long-Distance Pollen Dispersal in *Centaurea jacea*. *Plos One*, **4**: e6751.
- Ashman TL, Knight TM, Steets JA, Amarasekare P, Burd M, Campbell DR, et al. 2004.** Pollen limitation of plant reproduction: Ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, **85**: 2408-2421.
- Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemuller R, Edwards M, Peeters T, et al. 2006.** Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, **313**: 351-354.
- Byers DL. 1995.** Pollen quantity and quality as explanations for low seed set in small populations exemplified by *Eupatorium* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, **82**: 1000-1006.
- Campbell LG, Husband BC. 2007.** Small populations are mate-poor but pollinator-rich in a rare, self-incompatible plant, *Hymenoxys herbacea* (Asteraceae). *New Phytologist*, **174**: 915-925.
- Charnov EL. 1976.** Optimal foraging, themarginal value theorem. *Theoretical Population Biology*, **9**: 129-136.
- Cheptou PO. 2011.** Clarifying Baker's Law. *Annals of Botany*. First published online June 17, 2011 doi:10.1093/aob/mcr127.
- Cheptou PO, Avendano LG. 2006.** Pollination processes and the Allee effect in highly fragmented populations: consequences for the mating system in urban environments. *New Phytologist*, **172**: 774-783.
- COM. 1992.** Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. Official Journal of the European Communities L 206, 22.7 1992:7.
- Cosacov A, Nattero J, Cocucci AA. 2008.** Variation of Pollinator Assemblages and Pollen Limitation in a Locally Specialized System: The Oil-producing *Nierembergia linariifolia* (Solanaceae). *Annals of Botany*, **102**: 723-734.
- Cunningham SA. 2000.** Depressed pollination in habitat fragments causes low fruit set. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **267**: 1149-1152.
- Dauber J, Biesmeijer JC, Gabriel D, Kunin WE, Lamborn E, Meyer B, et al. 2010.** Effects of patch size and density on flower visitation and seed set of wild plants: a pan-European approach. *Journal of Ecology*, **98**: 188-196.
- de Jong TJ, Batenburg JC, Klinkhamer PGL. 2005.** Distance-dependent pollen limitation of seed set in some insect-pollinated dioecious plants. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*, **28**: 331-335.
- Delmas R. 1976.** Contribution à l'étude de la faune française des Bombidae (Hymenoptera, Apoidea, Bombidae). *Annales de la Société entomologique de France (n.s.)*: 247-290.
- Diekotter T, Haynes KJ, Mazeffa D, Crist TO. 2007.** Direct and indirect effects of habitat area and matrix composition on species interactions among flower-visiting insects. *Oikos*, **116**: 1588-1598.
- Donaldson J, Nanni I, Zachariades C, Kemper J, Thompson JD. 2002.** Effects of habitat fragmentation on pollinator diversity and plant reproductive success in renosterveld shrublands of South Africa. *Conservation Biology*, **16**: 1267-1276.
- Duffy KJ, Stout JC. 2008.** The effects of plant density and nectar reward on bee visitation to the endangered orchid *Spiranthes romanzoffiana*. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*, **34**: 131-138.
- Duncan DH, Nicotra AB, Wood JT, Cunningham SA. 2004.** Plant isolation reduces outcross pollen receipt in a partially self-compatible herb. *Journal of Ecology*, **92**: 977-985.

- Eckert CG, Kalisz S, Geber MA, Sargent R, Elle E, Cheptou PO, *et al.* 2010. Plant mating systems in a changing world. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**: 35-43.
- Escaravage N, Pornon A, Doche B, TillBottraud I. 1997. Breeding system in an alpine species: *Rhododendron ferrugineum* L (Ericaceae) in the French northern Alps. *Canadian journal of botany*, **75**: 736-743.
- Escaravage N, Wagner J. 2004. Pollination effectiveness and pollen dispersal in a *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) population. *Plant Biology*, **6**: 606-615.
- Geber MA, Moeller DA. 2006. Pollinator responses to plant communities and implications for reproductive character evolution. In: Harder LD, Barrett SCH eds. *The ecology and evolution of flowers*. Oxford University Press.
- Ghazoul J. 2005. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. *Biological Reviews*, **80**: 413-443.
- Ghazoul J. 2006. Floral diversity and the facilitation of pollination. *Journal of Ecology*, **94**: 295-304.
- Gonzalez-Varo JP, Arroyo J, Aparicio A. 2009. Effects of fragmentation on pollinator assemblage, pollen limitation and seed production of Mediterranean myrtle (*Myrtus communis*). *Biological Conservation*, **142**: 1058-1065.
- Goulson D, Lye GC, Darvill B. 2008. Decline and conservation of bumble bees. *Annual Review of Entomology*, **53**: 191-208.
- Goulson D, Stout JC, Hawson SA, Allen JA. 1998. Floral display size in comfrey, *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae): relationships with visitation by three bumblebee species and subsequent seed set. *Oecologia*, **113**: 502-508.
- Hanley ME, Franco M, Pichon S, Darvill B, Goulson D. 2008. Breeding system, pollinator choice and variation in pollen quality in British herbaceous plants. *Functional Ecology*, **22**: 592-598.
- Hatfield RG, LeBuhn G. 2007. Patch and landscape factors shape community assemblage of bumble bees, *Bombus spp.* (Hymenoptera : Apidae), in montane meadows. *Biological Conservation*, **139**: 150-158.
- Kalisz S, Vogler DW, Hanley KM. 2004. Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature*, **430**: 884-887.
- Kearns CA, Inouye DW, Waser NM. 1998. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **29**: 83-112.
- Kennedy BF, Elle E. 2008. The reproductive assurance benefit of selfing: importance of flower size and population size. *Oecologia*, **155**: 469-477.
- Knight TM, Steets JA, Ashman TL. 2006. A quantitative synthesis of pollen supplementation experiments highlights the contribution of resource reallocation to estimates of pollen limitation. *American Journal of Botany*, **93**: 271-277.
- Knight TM, Steets JA, Vamosi JC, Mazer SJ, Burd M, Campbell DR, *et al.* 2005. Pollen limitation of plant reproduction: Pattern and process. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **36**: 467-497.
- Kunin WE. 1993. Sex and the single mustard: population density and pollinator behavior effects on seed-set. *Ecology*, **74**: 2145-2160.
- Kunin WE. 1997. Population size and density effects in pollination: Pollinator foraging and plant reproductive success in experimental arrays of *Brassica kaber*. *Journal of Ecology*, **85**: 225-234.
- Kwak MM, Jennersten O. 1991. Bumblebee visitation and seedset in *Melampyrum pratense* and *Viscaria vulgaris*: heterospecific pollen and pollen limitation. *Oecologia*, **86**: 99-104.
- Laverty TM. 1992. Plant interactions for pollinator visits: a test of the magnet species effect. *Oecologia*, **89**: 502-508.
- Lazaro A, Lundgren R, Totland O. 2009. Co-flowering neighbors influence the diversity and identity of pollinator groups visiting plant species. *Oikos*, **118**: 691-702.
- Lennartsson T. 2002. Extinction thresholds and disrupted plant-pollinator interactions in fragmented plant populations. *Ecology*, **83**: 3060-3072.
- Lopes LE, Buzato S. 2007. Variation in pollinator assemblages in a fragmented landscape and its effects on reproductive stages of a self-incompatible treelet, *Psychotria suterella* (Rubiaceae). *Oecologia*, **154**: 305-314.
- Loreau M, Naeem S, Inchausti P, Bengtsson J, Grime JP, Hector A, *et al.* 2001. Ecology - Biodiversity and ecosystem functioning: Current knowledge and future challenges. *Science*, **294**: 804-808.

- Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CFE, Navarro C. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, **95**: 255-273.
- Mitchell RJ, Flanagan RJ, Brown BJ, Waser NM, Karron JD. 2009. New frontiers in competition for pollination. *Annals of Botany*, **103**: 1403-1413.
- Moeller DA. 2004. Facilitative interactions among plants via shared pollinators. *Ecology*, **85**: 3289-3301.
- Morales CL, Traveset A. 2008. Interspecific pollen transfer: Magnitude, prevalence and consequences for plant fitness. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **27**: 221-238.
- Morgan MT, Wilson WG. 2005. Self-fertilization and the escape from pollen limitation in variable pollination environments. *Evolution*, **59**: 1143-1148.
- Ollerton J, Johnson SD, Hingston AB. 2006. Geographical variation in diversity and specificity of pollination systems. In: Waser NM, Ollerton J eds. *Plantpollinator interactions, from specialization to generalization.*, Chicago, IL: Chicago University Press.
- Ozenda P. 1985. *La végétation de la chaîne alpine dans l'espace montagnard européen*, Masson, Paris.
- Perfectti F, Gomez JM, Bosch J. 2009. The functional consequences of diversity in plant-pollinator interactions. *Oikos*, **118**: 1430-1440.
- Pornon A, Escaravage N, TillBottraud I, Doche B. 1997. Variation of reproductive traits in *Rhododendron ferrugineum* L (Ericaceae) populations along a successional gradient. *Plant Ecology*, **130**: 1-11.
- Rasmont P. 1999. Rapport préliminaire sur la faune des bourdons (Hymenoptera, Bombinae) des Pyrénées-Orientales; réserves de la Massane et du Vallon d'Eyne. *Travaux de la Réserve naturelle de la Massane, Banyuls-sur-Mer*: 1-17.
- Rathcke BJ. 1983. Competition and facilitation among plants for pollination. In: Real L ed. *Pollination Biology*. New York, Academic press.
- Rathcke BJ, Jules ES. 1993. Habitat fragmentation and plant pollinator interactions. *Current Science*, **65**: 273-277.
- Sargent RD, Ackerly DD. 2008. Plant-pollinator interactions and the assembly of plant communities. *Trends in Ecology & Evolution*, **23**: 123-130.
- Sargent RD, Kembel SW, Emery NC, Forrestel EJ, Ackerly DD. 2011. Effect of local community phylogenetic structure on pollen limitation in an obligately insect-pollinated plant. *American Journal of Botany*, **98**: 283-289.
- Schmitt J. 1980. Pollinator foraging behavior and gene dispersal in Senecio (Compositae). *Evolution*, **34**: 934-943.
- Sih A, Baltus MS. 1987. Patch size, pollinator behavior, and pollinator limitation in catnip. *Ecology*, **68**: 1679-1690.
- Spaethe J, Tautz J, Chittka L. 2001. Visual constraints in foraging bumblebees: Flower size and color affect search time and flight behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**: 3898-3903.
- Spigler RB, Chang SM. 2008. Effects of plant abundance on reproductive success in the biennial *Sabatia angularis* (Gentianaceae): spatial scale matters. *Journal of Ecology*, **96**: 323-333.
- Vamosi JC, Knight TM, Steets JA, Mazer SJ, Burd M, Ashman TL. 2006. Pollination decays in biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 956-961.
- Wagenius S. 2006. Scale dependence of reproductive failure in fragmented Echinacea populations. *Ecology*, **87**: 931-941.
- Wagenius S, Lyon SP. 2010. Reproduction of *Echinacea angustifolia* in fragmented prairie is pollen-limited but not pollinator-limited. *Ecology*, **91**: 733-742.
- Wilcock C, Neiland R. 2002. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science*, **7**: 270-277.
- Zhang ZQ, Li QJ. 2008. Autonomous selfing provides reproductive assurance in an alpine ginger *Roscoea schneideriana* (Zingiberaceae). *Annals of Botany*, **102**: 531-538.
- Zimmerman M, Pyke G. 1988. Reproduction in Polemonium: assessing the factors limiting seed set. *American Naturalist*, **131**: 723-738.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. Flower-visiting insects of *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae)

Order	Genus and Species	Bumble bee color pattern
Diptera	<i>Empis</i> sp. <i>Volucella Bombylans</i> (L.) <i>Andrena</i> sp. <i>Syrphus</i> sp. <i>Eristalis</i> sp.	
Hymenoptera	<i>Apis mellifera</i> (L.) <i>Lasioglossum fratellum</i> (Pérez) <i>Lasioglossum albipes</i> (Fabricius) <i>Formica</i> sp. ¹	
	<i>Bombus</i> (<i>Bombus</i>) <i>lucorum</i> (L.) <i>Bombus</i> (<i>Kallobombus</i>) <i>soroeensis</i> (Fabricius) <i>ssp. lectitatus</i> (Kruseman) <i>Bombus</i> (<i>Bombus</i>) <i>terrestris</i> (L.) <i>ssp. lusitanicus</i> (Krüger)	Terrestris
	<i>Bombus</i> (<i>Thoracobombus</i>) <i>runderarius</i> (Müller) <i>ssp. montanus</i> (Lepeletier) <i>Bombus</i> (<i>Alpigenobombus</i>) <i>wurfleini</i> (Radoszkowski) <i>ssp. pyrenaicus</i> (Vogt) ² <i>Bombus</i> (<i>Psithyrus</i>) <i>rupestris</i> (Fabricius) <i>ssp. vasco</i> (Lepeletier) <i>Bombus</i> (<i>Pyrobombus</i>) <i>monticola</i> (Smith) <i>ssp. rondoui</i> (Vogt)	Pyrenes
	<i>Bombus</i> (<i>Thoracobombus</i>) <i>humilis</i> (Illiger) <i>ssp. quasimuscorum</i> (Vogt) <i>Bombus</i> (<i>Thoracobombus</i>) <i>pascuorum</i> (Scopoli) <i>ssp. maculatus</i> (Vogt)	Muscorum
	<i>Bombus</i> (<i>Rhodobombus</i>) <i>mesomelas</i> (Gerstaecker) <i>Bombus</i> (<i>Thoracobombus</i>) <i>sylvarum</i> (L.)	Mesomelas
	<i>Bombus</i> (<i>Confusibombus</i>) <i>confusus</i> (Schenck) <i>Bombus</i> (<i>Thoracobombus</i>) <i>runderarius</i> (Müller) <i>ssp. runderarius</i> (Lepeletier) <i>Bombus</i> (<i>Melanobombus</i>) <i>lapidarius</i> (L.)	Lapidarius
	<i>Bombus</i> (<i>Ashtonipsityrus</i>) <i>bohemicus</i> (Seidl)	Vestalis
Lepidoptera	<i>Aglais urticae</i> (L.) <i>Inachis io</i> (L.) <i>Macroglossum stellatarum</i> (L.)	

¹ We did not include ants (Formicidae, Hymenoptera) in walk-transect surveys since they are not pollen vectors for *R. ferrugineum* (Escaravage and Wagner 2004)

² Nectar robber (Rasmont, 1988)

Few collections were made at the end of the experiment. The list is not exhaustive. Consequently, rare species may not be included in this table but may be present in the visitor assemblage data set of the manuscript if observed during walk-transects.

Bumble bees were classified by color patterns as done by Rasmont (1999) for Pyrenean bumble bees.

Escaravage N, Wagner J. 2004. Pollination effectiveness and pollen dispersal in a *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) population. *Plant Biology*, **6**: 606-615.

Rasmont P. 1999. Rapport préliminaire sur la faune des bourdons (Hymenoptera, Bombinae) des Pyrénées-Orientales; réserves de la Massane et du Vallon d'Eyne. *Travaux de la Réserve naturelle de la Massane, Banyuls-sur-Mer*: 1-17.

Rasmont P. 1988. *Monographie écologique et zoogéographique des Bourdons de France et de Belgique (Hymenoptera, Apidae, Bombinae)*. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux.

CHAPITRE 2

Effects of mate versus pollinator availabilities on pollen transfer and limitation in a mass-flowering species

Effects of mate versus pollinator availabilities on pollen transfer and limitation in a mass-flowering species

Chloé E.L. Delmas^{1,2*}, Thomas L.C. Fort^{1,2}, Nathalie Escaravage^{1,2}, André Pornon^{1,2}

¹ *Université de Toulouse, ENFA; UMR 5174 EDB (Laboratoire Évolution & Diversité Biologique) ; 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France*

² *CNRS, Université Paul Sabatier; UMR 5174 EDB, F-31062 Toulouse, France*

* *For correspondence. E-mail: chloedelmas@gmail.com*

(soumis)

ABSTRACT

The evolutionary response of plant populations to pollen limitation is likely to depend on the extent to which pollen loads are affected by pollinator and/or mate limitation. The relative contribution of both factors to pollen load deposition has rarely been evaluated in natural populations. We investigated the impact of plant mate and pollinator availabilities on the transport and receipt of pollen and on pollen limitation along a natural spatial pattern gradient of heathland patches structured by the self-compatible and mass-flowering shrub *Rhododendron ferrugineum*. Visitor density was negatively related to *R. ferrugineum* floral availability and conspecific pollen (CP) quantity carried by foraging insects was found to be reduced with increasing visitor density. Overall, CP loads deposited on stigmas by pollinators (emasculated flowers) were low and resulted in pollen limitation both in the low and high floral availability patches. CP deposition was limited by pollinator visits in large dense patches and by conspecific plant availability in small sparse patches. However, the mass-flowering habit of the shrub and the constancy of the most abundant visitor resulted in a high proportion of CP carried and deposited, even in small sparse patches. Self-pollination alleviated pollen limitation (control flowers) all along the plant spatial pattern gradient through an increase in CP matching up to the number of available ovules and a decrease in heterospecific pollen (HP) deposition on stigmas. Our study highlights the relative contribution of mate versus pollinator availabilities to selective pressures on the mating system such as pollen limitation.

Key words. Mass-flowering; Mate; Pollen transport; Pollinator; Self-compatibility

INTRODUCTION

The ecological and evolutionary responses of plant populations to pollen limitation are likely to depend on the extent to which pollen receipt is affected by reduced pollinator visitation versus reduced number or density of conspecific pollen donors (Holsinger 1996; Goodwillie et al. 2005; Eckert et al. 2010). Since there is increasing evidence that human disturbances have direct effects on plant and pollinator populations (Aguilar et al. 2006; Bjerknes et al. 2007; Hegland et al. 2009), understanding the impact of mate and pollinator limitations on plant reproduction is currently a major scientific challenge. However, the relative contributions of each of these factors to pollen receipt pattern have rarely been evaluated in natural populations, especially in self-compatible species.

For a given plant species, mate availability depends on the number of conspecific neighbors relying on plant spatial pattern features such as patch size, density and isolation (Ghazoul 2005). Plant spatial pattern changes may alter both mate and pollinator availabilities (Dauber et al. 2010), leading to a reduction in the quantity and quality of the pollination services provided (Duncan et al. 2004) and/or leading to changes in pollinator behaviour. For instance, a reduction in plant availability may lead to generalist pollinators visiting co-flowering species resulting both in heterospecific pollen (HP) deposition on stigmas and conspecific pollen (CP) loss to foreign stigmas with subsequent negative consequences on plant reproductive output (Wilcock and Neiland 2002; Morales and Traveset 2008). The responses of pollinators to spatial patterns of plant communities are determinant for the quantity and quality of pollen carried by pollinators (Geber and Moeller 2006). Although rarely studied and likely to be crucial for plant reproduction, insect external pollen loads provide better information about plant-pollinator interactions in the community than stigmatic pollen loads that are indicative of the pollination services provided. Stigmatic pollen loads depend on pollinator behavior as well as on mechanisms preventing HP transfer from the pollinator's body to the stigmas. The relationship between stigmatic pollen receipt and pollen carried by pollinators has rarely been measured and is largely unknown.

As suggested by a recent review (Eckert et al. 2010), plant mate and pollinator limitations may occur independently or co-occur because habitat perturbation can diminish both flowering plant density and pollinator populations leading to various consequences on pollen transported and deposited by pollinators and subsequent pollen limitation. First, in large and dense populations, the number and density of conspecifics is not likely to limit plant reproduction which depends mostly on pollinator availability. When pollinator availability is

high, as commonly observed in highly attractive plant population (Sih and Baltus 1987), high stigmatic pollen loads with a high proportion of CP is expected, likely leading to an absence of pollen limitation (Waites and Agren 2004). On pollinator dilution between numerous conspecific flowers (low pollinator availability and high competition between conspecific plants), stigmatic pollen loads should be low leading to a high mean pollen limitation but a high proportion of CP deposit. Moreover, pollen limitation should be highly variable among individuals due to the low likelihood of flower visitation. The strength of pollen limitation variance among individuals is a determining factor for the evolutionary outcome of plant mating system (Eckert et al. 2010). Second, in small and sparse populations, both pollinators and mates can be reduced leading to low stigmatic pollen loads with a low proportion of CP (if co-flowering plants share pollinators) which is likely to result in high mean pollen limitation associated to low variance among individuals (Eckert et al. 2010). However, when pollinator availability is high in such patches and if co-flowering plants share pollinators, stigmatic pollen loads should be high with a low proportion of CP leading to strong mean pollen limitation but highly variable among individuals (Knight 2003; Duncan et al. 2004; Jakobsson et al. 2009). Indeed, in generalist foraging behaviour, high pollinator density leads to diet breadth expansion as a result of a more competitive environment (Fontaine et al. 2008). However, a high proportion of CP may be deposited on stigmas resulting from insect specialization, constancy or passive constancy of pollinators as an optimal strategy occurring when pollinators including generalists encounter a monospecific patch or a mass-flowering species (Thomson 1980; Chittka et al. 1999). This may enhance the proportion of CP in pollen loads of pollinators and stigmas but may also increase geitonogamous pollination (Eckert 2000). In this case, low and pure pollen loads may be deposited on stigmas due to conspecific plant limitation and the sharing of a common pollen pool between pollinators. Integrating both gradients of conspecific plant and pollinator availabilities along with analyses of pollen transported and deposited by pollinators is a crucial step towards a better understanding of how human disturbances impact the selective pressures impinging on plant mating system.

In this study, we tested the theoretical framework detailed above along a spatial pattern gradient of *Rhododendron ferrugineum* L. patches. This self-compatible and mass-flowering shrub (Ericaceae) structures heathland communities that are widely and patchily distributed in the French Pyrenees and Alps between 1600 and 2300 m on north-to-west facing slopes (Ozenda 1985). The size and isolation of heathland patches in subalpine landscapes and the within-patch size and density of *R. ferrugineum* floral display are highly variable. In many areas, heathland spatial pattern mainly results from recurrent age-long burning and livestock

grazing, decreasing the cover of the shrub and increasing the distance between heathland patches in meadows. This natural pattern allowed the use of a whole gradient of plant spatial distribution from large dense patches to small sparse ones. Mass-flowering strategies producing an enhanced concentration of resources and high pollinator attractiveness (Augspurger 1980,1981) could lead to a specific response of plants and pollinators to changes in plant spatial pattern and particular patterns of pollen transfer and pollen limitation (Eckert 2000; Dominguez et al. 2005).

Here, we investigated the role of conspecific plant versus pollinator availabilities on pollinator and stigmatic pollen loads and pollen limitation in natural *R. ferrugineum* heathland patches. In hermaphroditic self-compatible species, pollen is deposited through pollinator foraging activity and / or autonomous self-pollination and determining their relative contribution to pollen receipt in populations of contrasting mate availability is challenging. Specifically, we addressed the following questions: (i) Does pollinator availability change with plant spatial pattern? How do mate versus pollinator availabilities affect (ii) the quantity and the quality of pollen carried by the most abundant pollinators and deposited on stigmas? (iii) pollen limitation and autonomous self-pollination?

MATERIALS AND METHODS

Study species and study area

Rhododendron ferrugineum is an evergreen shrub with well branched trailing stems of 0.7-0.8 m height. Its massive floral display consists of numerous inflorescences of 10.8 (6-17) bright red nectariferous tubular flowers and reaches more than 3000 flowers per m² in some places (Escaravage et al. 1997; Pornon et al. 1997). This species is protandrous, self-compatible and reproduces both sexually (mixed mating system) and vegetatively through layering. Spontaneous selfing occurs in the absence of pollinators (Escaravage et al. 1997). The flowering period of a population lasts for 20-30 days. Flowers last about 10 days and are initiated the year before they mature (Escaravage et al. 1997). On the study site, *R. ferrugineum* is mainly visited and pollinated by *Bombus sp.* (Hymenoptera) and *Empis sp.* (Diptera) (Delmas et al., unpublished data).

The study was conducted on a 3 km² area in the French Central Pyrenees (southern France), near the village of Camurac (42°46'31"N; 01°55'45"E). Altitudes range from 1550 m to 1750 m a.s.l. and the snow cover usually lasts from late October until May. The

heathland communities studied were spatially distributed into visually distinct patches, i.e., aggregation of shrubs embedded in their associated flowering community and separated from other patches by non-heathland meadows. All heathland patches found in the 3 km² area (n = 27) were surveyed. The study site was surrounded by meadows without *R. ferrugineum*.

Plant spatial pattern

To describe spatial patterns of *R. ferrugineum*, we randomly selected 105 individuals in 27 heathland patches (2 to 6 shrubs per patch). We used 5 spatial variables recorded at the patch and individual spatial scales: (1) Patch closeness: the median distance between each target patch and its three nearest patches; (2) *R. ferrugineum* floral display density (number of inflorescences in a 400 m² area): the product of the mean number of inflorescences in a 0.25 x 0.25 m plot randomly placed on 20 shrubs and 0.25⁻² x COV. COV is the coverage of *R. ferrugineum* in each patch measured by the area occupied by shrubs in a 400m² plot randomly placed at the patch core; (3) Total *R. ferrugineum* floral display size in each patch: the product of *R. ferrugineum* floral display density and total patch area obtained from geographic coordinates of patch perimeters recorded every 5 meters and analyzed in OziExplorer (GPS mapping software, version 3.95.4m, Des Newman); (4) Individual isolation: the median distance between each target shrub and its three nearest neighbors; (5) Individual floral display size measured by counting the total number of inflorescences on each shrub.

Plant mate availability is indirectly inferred from these 5 variables since it is not possible to count the number of individuals in the largest and most dense patches. Because most of the variables included in the study were inter-correlated and may act conjointly on pollinators, we used principal components analysis (PCA) in R v.2.10.0 (R Development Core Team, <http://www.r-project.org>) to reduce the five parameters to composite spatial pattern indices. PCA produces linear combinations of the original variables to generate the axis (principal components) and synthesize the spatial pattern of each heathland patch. This analysis was performed on a log-transformed data matrix with the 5 spatial parameters (variables) associated with the 105 target shrubs (samples). Logarithmic-transformation equalizes variances for data skewed with various ranges of values. Pearson correlations were performed between the 2 principal components extracted with an eigenvalue greater than 1 (hereafter indices 1 and 2) and the original spatial variables to assess which of these parameters contribute most to dataset variance (variance in spatial pattern). We averaged PCA

scores (indices 1 and 2) of the target shrubs from the same patch in order to obtain a mean score per patch ($n = 27$).

Surveys of flower visitor availability

To estimate visitor abundance in each patches, we conducted standardized surveys of *R. ferrugineum* flower-visiting insects during the entire *R. ferrugineum* flowering season (1 June to 10 July 2010) when relatively sunny and clear conditions favored pollinator activity. We surveyed each patch twice over the sampling period at least a week apart. Days and hours (10:00 – 14:00 and 14:00 – 18:00) of sampling were random across patches for the first sampling round. For the second round, we performed the survey in the morning if it was done in the afternoon during the first round and *vice versa* due to potential temporal differences in pollinator activity. During each sampling period, one person slowly walked along a 50 x 2 m transect randomly placed at the patch core for 15 min (total sampling time of 810 minutes) and recorded all visitors to *R. ferrugineum* flowers at random as they came.

We assessed the abundance of *R. ferrugineum* visitors from the mean number of foraging insects per patch. In order to take into account the non-homogeneous proportion of *R. ferrugineum* across heathland patches and infer potential pollination services, the abundance must be scaled by the proportion of *R. ferrugineum* coverage in each patch to assess visitor density.

Visitor pollen loads

To assess quantity and quality (CP or HP) of total pollen carried by flower visitors, during one hour per patch we randomly collected *R. ferrugineum* flower visitors of the most abundant genus (*Bombus sp.* and *Empis sp.*) at the end of transect walks (see above) in a subset of 17 patches representative of the whole gradient of plant spatial pattern. Fifty three foraging insects were collected, 9 *Empis* (Diptera) and 44 *Bombus* (Hymenoptera). These different sample sizes matched up with the relative abundance of each order recorded during transect walks. Insects were caught using a net, killed in ethyl acetate, stored in individual tubes and frozen until processed in the laboratory. Before pollen load analyses, we identified bumblebees and Empididae to species level according to a reference collection of insects collected in 2009 on the study site and identified by specialists (see Acknowledgements).

We systematically dabbed each insect with a small gelatin-fuchsin cub (see Dafni 1992) to sample and stain its pollen. The gel was placed on a slide, heated to melting point and

covered with a cover slip after pollen homogenisation with a thin pin. Between insects, we thoroughly cleaned the forceps used during sampling. We avoided pollen storage areas such as pollen baskets on bumblebees as these contain pollen unlikely to be available for pollination and we assumed that the quality of the body's pollen load to be similar to that of the pollen baskets.

We performed pollen counts on each slide under a binocular microscope. We differentiated between conspecific *R. ferrugineum* pollen (tetrad pollen) and HP from co-flowering plant species. During *R. ferrugineum* flowering period, no other Ericaceae with tetrad pollen was in bloom allowing the direct assessment of CP amount. When pollen quantity did not allow direct count (usually more than 1,000 pollen grains), we separated the slide into 100 squares of 1 mm² and counted and identified the pollen grains in 7 squares randomly placed on the slide. We assessed the total number of pollen grains by multiplying the mean number of grains per square by the total number of squares where pollen grains were found. The number of conspecific tetrads was multiplied by 4 to obtain the number of pollen grains. The pollen load of insects collected in the same patch was averaged to obtain a mean pollen load per patch and avoid pseudo-replication. We referred to pollen quantity as the absolute number of pollen grains counted and to pollen quality to distinguish HP from CP (regardless of pollen viability or whether it is cross- or self-pollination). We did not identify pollen species since the focus of this study was on the proportion of CP versus HP rather than on pollen diversity.

Stigmatic pollen loads and pollen limitation

In June 2010, we performed flower emasculation on the 105 target shrubs by excising the anthers thus avoiding self-pollen deposition and to assess actual pollen delivery by pollinators. Flowers from two inflorescences were emasculated on each individual and left to natural pollination. At the end of the flowering period when the petals wilted, we randomly collected one style from each of the manipulated inflorescences using forceps into individual 1.5 ml plastic microcentrifuge tubes. At the same time, we also randomly selected on each individual two styles from control flowers (left un-manipulated). Each style was stored in 70% ethanol and stigmas were then mounted in fuchsin stain (see Kearns and Inouye 1993) on a glass slide. The whole of the pollen load was counted on each stigma. We differentiated between *R. ferrugineum* pollen tetrads (CP) and pollen grains from co-flowering plant species

(HP). The number of conspecific tetrads was multiplied by 4 to obtain the number of pollen grains.

We assessed the relative contribution of self-pollen to stigmatic pollen loads for each individual by subtracting the mean number of CP grains recorded in stigmatic pollen loads of emasculated flowers from that of control flowers. We then obtained the mean relative contribution of self-pollination per patch.

We assessed pollen limitation by the ratio: stigmatic conspecific pollen-load / number of available ovules per ovary (Neiland and Wilcock 1995). The mean number of ovules per ovary per target shrub was quantified by collecting 2 inflorescence buds per individual before blooming and preserving them in 70% alcohol. Two flowers from each inflorescence bud were dissected under a stereomicroscope and the ovules were counted. The mean pollen-load:ovules ratio for each target shrub and each treatment (pollen loads from emasculated and control flowers) were calculated. Pollen limitation per patch was the average of the pollen-load ratios of shrubs from the same patch.

Statistical analysis

To test the relationships between (i) *R. ferrugineum* visitor availability, (ii) relative contribution of self-pollination and (iii) pollen limitation with the two composite spatial pattern variables (indices 1 and 2 from the PCA), we used simple linear regression analyses with the REG procedure in SAS (software package, v. 9.1, SAS Institute 2003). We tested model residuals for adherence to a normal distribution and homogeneity of variances, and response variables were square-root or log transformed prior to analysis when necessary.

To test the impact of each *R. ferrugineum* spatial pattern index and visitor availability on pollinator and stigmatic pollen loads (quantity of conspecific, heterospecific and total pollen grains), we used Generalized Linear Mixed Models (GLIMMIX procedure in SAS) with Poisson error and an overdispersion component to the variance function. When non-linear relationships were found, we used the NLIN procedure in SAS. We used quasi-likelihood estimation for proportions with unknown distribution to estimate the impact of *R. ferrugineum* spatial pattern and pollinator availability on the proportion of CP in pollinator and stigmatic pollen loads (McCullagh and Nelder 1989). Pollen load analyses of insects per patch were weighted by the number of insects collected in each patch.

To assess the strength of variation among individuals (plants and insects) for pollen loads, we separated heathland patches in two categories of *R. ferrugineum* flower availability

(high versus low availability) and calculated a coefficient of variation in each category. Twelve patches were categorized as high mate availability patches and had PCA index 1 scores higher than zero. Sixteen patches were categorized as low mate availability patches and had scores of index 1 lower than zero.

RESULTS

Plant spatial pattern description

Spatial pattern characteristics are listed in Table 1. Heathland patch areas ranged from 0.01 to 15.77 ha (1.73 ± 0.38 ha). Within heathland patches, the proportion of *R. ferrugineum* coverage ranged from 0.18% to 98%.

Table 1. Description of the five spatial variables used to assess plant spatial patterns of *R. ferrugineum* heathland patches.

Scale	Spatial variables	Range	Mean \pm SE
<i>R. ferrugineum</i> individual scale	Individual floral display	19 to 7,500 infl.	851.2 \pm 134
	Isolation	0 to 43 m	6.5 \pm 0.9
Patch scale	<i>R. ferrugineum</i> floral display density	97 to 109,441 infl. / 400 m ²	25,820.4 \pm 3,330.8
	Total <i>R. ferrugineum</i> floral display size	170 to 33,567,317 infl.	2,529,257.1 \pm 687,124.7
	Heathland patch closeness	50 to 378 m	137 \pm 7.6

Abbreviations: infl.: inflorescences; m: meter.

R. ferrugineum spatial pattern was accurately assessed by the first two PCA-indexes which cumulatively explained 86.9% of the variation (Online Resource 1). The first principal component explained 67.4% of the variance and was largely driven by patch density and *R. ferrugineum* floral display characteristics (index 1, Online Resource 2). Indeed, an increasing index 1 corresponded to an increasing size and density of *R. ferrugineum* total floral display, an increasing size of individual floral display and decreasing individual isolation (Online Resource 2). Index 1 is therefore an indirect measure of mate availability. Hereafter, we refer to index 1 as floral availability index. The second principal component (index 2) explained 19.5% of the variance and was mainly driven by patch closeness (Online Resources 1 and 2). The higher the score for index 2, the greater the patch closeness.

Plant spatial pattern impact on visitor availability

During transect walks, we recorded 428 visits to *R. ferrugineum* of individuals belonging to Hymenoptera, Diptera and Lepidoptera. Hymenoptera (64%, mainly *Bombus sp.*) and Diptera (28%, mainly *Empis pandellei* Daugeron, 1999) were the most abundant visitors. Among the ten *Bombus* species identified (see Online Resource 3), *B. soroensis lectitatus* and *B. wurfleini pyrenaicus* were the most abundant visitors (36% and 39% of Hymenoptera visits respectively). It is worth noticing that, like other *Alpigenobombus* species, *B. wurfleini* usually bit holes in the sides of the flowers to access floral nectar, often without providing pollination services (Rasmont 1988). Therefore, we did not include this type of visit in the data set.

R. ferrugineum floral availability index had a significant positive impact on total visitor abundance (Fig.1a). However, the increase in flower availability was larger than the increase in visitor abundance (saturation in large and dense patches) resulting in a significant decrease in visitor density with enhancing *R. ferrugineum* floral availability (Fig. 1b). The decrease was significant for Hymenoptera ($R^2 = 0.30$, $p = 0.004$), Diptera ($R^2 = 0.17$, $p = 0.03$) and Lepidoptera ($R^2 = 0.24$, $p = 0.01$). No relationship was found between heathland patch closeness and *R. ferrugineum* visitor abundance and density ($R^2 = 0.0007$, $p = 0.90$ and $R^2 = 0.03$, $p = 0.35$, respectively).

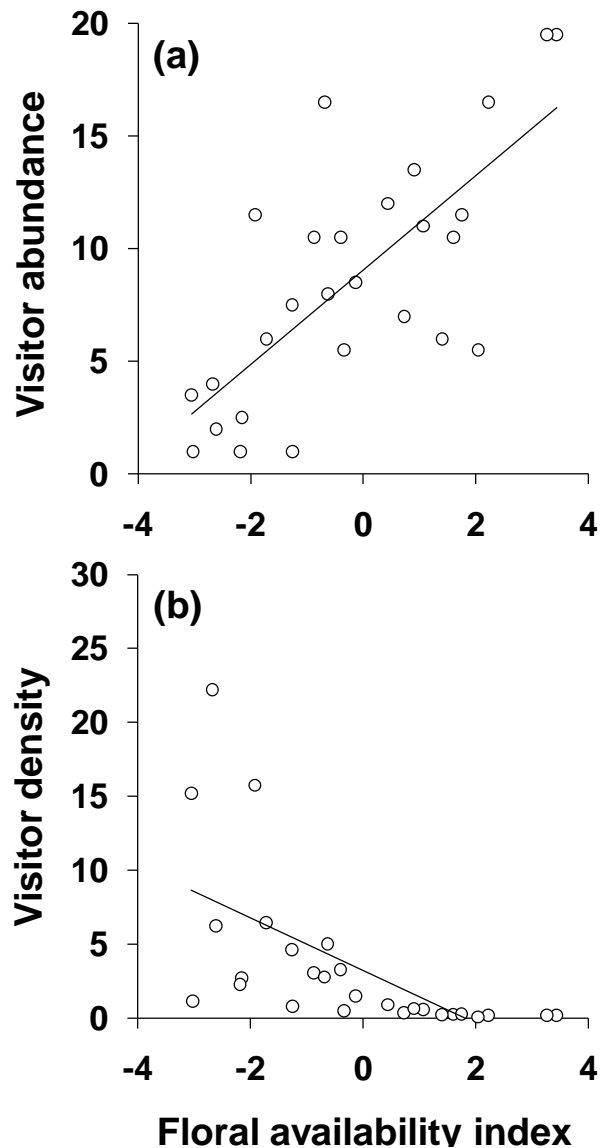


Figure 1. Relationships between a) visitor abundance ($R^2=0.53$, $p < 0.0001$) and b) visitor density ($R^2=0.72$, $p < 0.0001$) and *Rhododendron ferrugineum* floral availability index

Impact of plant mate and visitor availabilities on visitor's pollen loads

Bombus wurfleini individuals were excluded from the analyses since it was not easy to differentiate insects entering the corolla from insect nectar robbers during the collection survey. Pollen loads from patches where this species was recorded did not differ from patches without apparent nectar robbing. The small number of bumblebees collected belonging to species other than *B. soroensis* (n = 19) did not allow species-scale analyses. A description of pollen load analyses is presented in Table 2.

Table 2 Pollen load analyses of flower visitors and stigmas.

		Conspecific pollen		Heterospecific pollen		Conspecific pollen % per insect	
		Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range
Flower visitors	Overall visitors n = 53	2,878.6	8 - 14,044	3,351.6	0 - 45,397	68	0.8 - 100
	Total <i>Bombus</i> n = 44	3,453.2	52 - 14,044	4,028.2	0 - 45,397	70.8	0.8 - 100
	<i>B. soroensis</i> n = 19	3,096.6	472 - 8,892	180.6	0 - 691	92.8	70 - 100
	Other <i>Bombus</i> n = 25	3,724.2	52 - 14,044	6,952.4	0 - 45,397	54.0	0.8 - 100
	<i>Empis pandellei</i> n = 9	69.3	8 - 360	43.8	7 - 137	54	14 - 85
Stigmas	Emasculated n = 100	249.4	0 - 1,502	8.9	0 - 74.5	83.3	0 - 100
	Control n = 99	540.7	0 - 3,294	5.6	0 - 36	94.8	0 - 100

Sample sizes (n) represent the number of individuals (insect or plant) used.

Overall, CP and HP quantity was highly variable among individuals resulting in large range of pollen load quantities and qualities. *Bombus sp.* carried much higher pollen loads (CP and HP) than *E. pandellei* (Table 2). The mean proportion of CP recorded per insect was high (70.8%), especially for the most abundant non-cheating pollinator *B. soroensis* (92.9%) which carried very low amounts of HP (Table 2). Interestingly, other bumblebees carried lower proportions of CP (54%) than *B. soroensis* mainly as a result of their higher HP loads (Table 2).

Except for a significant negative impact on HP amount in *B. soroensis* pollen loads, *R. ferrugineum* floral availability had no significant effect on CP, HP or on the total number of pollen grains carried whatever the flower visitor considered (Table 3). The average

proportion of CP recorded per insect increased significantly with increasing *R. ferrugineum* floral availability in overall visitors and total *Bombus* pollen loads only (Table 3). Interestingly, the proportion of CP in *Bombus* pollen loads largely exceeded the proportion of *R. ferrugineum* coverage per patch (Fig. 2; paired t-test on arcsine transformed proportions: total *Bombus*, $t = -3.8$, $P = 0.0018$, *B. soroensis*, $t = -4.30$, $P = 0.0026$ and other *Bombus*, $t = -2.22$, $P = 0.04$). Finally, CP quantity in overall, *Bombus* and *B. soroensis* pollen loads increased with increasing heathland patch closeness (Table 3).

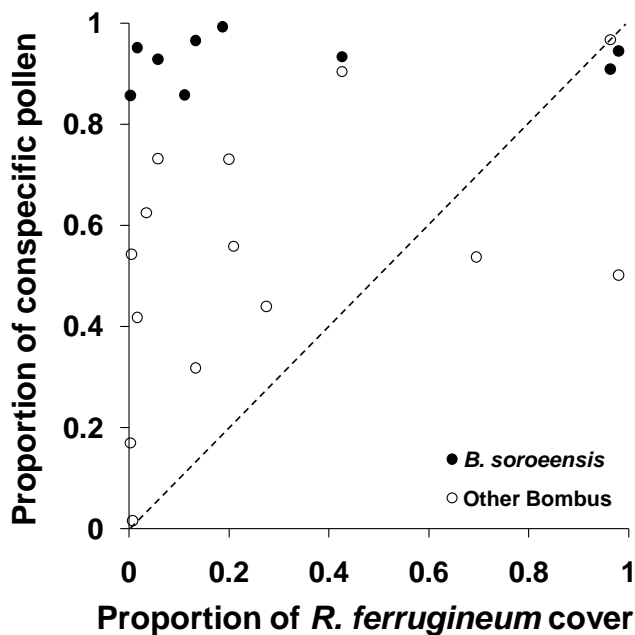


Figure 2. Proportion of conspecific pollen in insect pollen loads (*B. soroensis* and other *Bombus*) versus proportion of *R. ferrugineum* coverage per patch. Above the dotted line, proportion of conspecific pollen in pollen loads is higher than the *R. ferrugineum* cover proportion.

A significant and negative non-linear relationship was found between overall visitor density and the amount of CP (Fig. 3) and HP ($y = 721.1x^{-1.36}$, $F_{2,15} = 10.66$, $P = 0.001$) recorded in pollen loads. No relationship was found with total pollen quantity ($F_{1,15} = 0.22$, $P = 0.65$) while CP proportion per insect decreased significantly and linearly with increasing visitor density ($F_{1,15} = 6$, $P = 0.027$).

Although both coefficients of variation were high, variation was slightly higher in the low (CV = 132.3; 263.6; 164 and 53.5%) than in the high mate availability category (CV = 98.6; 253.3; 147.6 and 42.1%) for the number of CP, HP, total pollen grains and CP proportion, respectively.

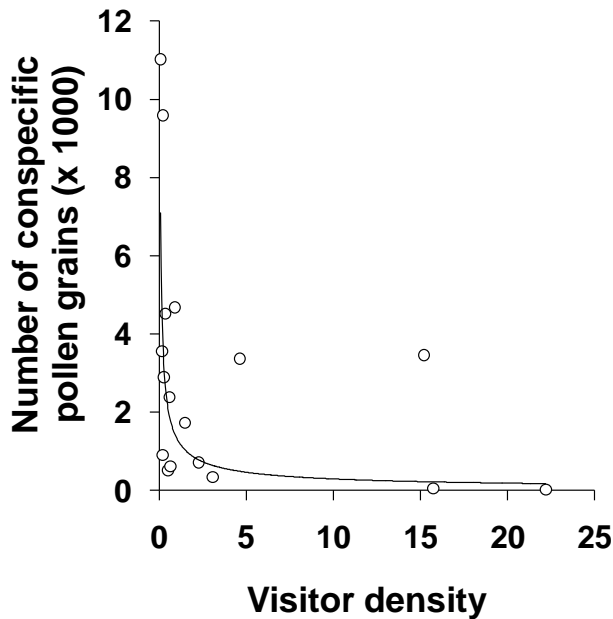


Figure 3. Relationship between conspecific pollen quantity in pollen loads of overall flower-visitors and *R. ferrugineum* visitor density ($y = 1595.8x^{-0.715}$, $F_{2,15} = 20.25$, $P < 0.0001$).

Impact of plant mate and visitor availabilities on stigmatic pollen loads and pollen limitation

We obtained pollen loads from 197 emasculated flowers and 195 control flowers ($n = 100$ and 99 individuals respectively). The remainders were lost due to deterioration by weather or animals. A description of stigmatic pollen load analysis is presented in Table 2. Less than 10% of emasculated and 3% of control flowers had no CP and 18 % of both treatments had no HP. The average CP quantity in stigmatic pollen loads was higher in control than in emasculated flowers (Table 2; paired t-test, $t = 5.50$, $P < 0.0001$) while the opposite was observed for HP loads (Table 2; $t = -2.33$, $P = 0.02$). Overall, self-pollination increased CP amount on stigmas by 316.2 pollen grains, and 85% of patches presented a self-pollination contribution greater than zero. Interestingly, the 15% remainders had intermediate levels of *R. ferrugineum* flower availability. The pollen-load:ovule ratio was significantly higher in control (1.17 ± 0.12) than emasculated (0.53 ± 0.06) flowers (paired t-test: $t = 5.31$, $P < 0.0001$).

CP, HP and total pollen number in stigmatic pollen loads from emasculated and control flowers were not affected by *R. ferrugineum* floral availability and patch closeness (Table 3). The proportion of CP in pollen loads from emasculated flowers increased significantly with increasing floral availability while no effect was found in control flowers (Fig. 4a; Table 3). The contribution of self-pollination to pollen loads was the same along both plant spatial pattern indices ($R^2 = 0.002$, $P = 0.8$ and $R^2 = 0.005$, $P = 0.72$ for floral availability and patch

closeness, respectively) as well as pollen limitation in emasculated ($R^2 = 0.003$, $P = 0.8$ and $R^2 = 0.02$, $P = 0.48$) and control flowers ($R^2 = 0.001$, $P = 0.88$ and $R^2 = 0$, $P = 0.99$).

Table 3 Generalized linear mixed models for pollen loads of *R. ferrugineum* flower visitors (overall, total *Bombus*, *Bombus soroeensis*, other *Bombus*, *Empis pandellei*) and stigmas (emasculated and control flowers) response variables: conspecific, heterospecific and total number of pollen grains and conspecific pollen proportion. Other *Bombus* included all *Bombus* species except *B. soroeensis*.

		Conspecific pollen		Heterospecific pollen		Total pollen		Conspecific pollen proportion		
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	
Flower visitors	Overall visitors n = 17	FA index	1.2 _{1,15}	0.29	0.11 _{1,15}	0.75	0.35 _{1,15}	0.6	11.17 _{1,15}	0.005 (+)
		PC index	8.4 _{1,15}	0.01 (+)	1.28 _{1,15}	0.28	3.14 _{1,15}	0.1	1.61 _{1,15}	0.22
	Total <i>Bombus</i> n = 16	FAI	0.56 _{1,14}	0.46	0.01 _{1,14}	0.91	0.10 _{1,14}	0.76	6.4 _{1,14}	0.02 (+)
		PCI	7.64 _{1,14}	0.015 (+)	0.88 _{1,14}	0.36	2.37 _{1,14}	0.15	0.46 _{1,14}	0.51
	<i>B. soroeensis</i> n = 9	FAI	4.66 _{1,7}	0.07	30.9	<0.001 (-)	6.13	0.05	0.79	0.41
		PCI	6.72 _{1,7}	0.04 (+)	1.07	0.34	7.01	0.04 (+)	0.41	0.55
	Other <i>Bombus</i> n = 14	FAI	3.78 _{1,12}	0.08	0.51 _{1,12}	0.49	1.44 _{1,12}	0.25	2.45 _{1,12}	0.14
		PCI	3.11 _{1,12}	0.10	1.63 _{1,12}	0.23	3.00 _{1,12}	0.11	0.41 _{1,12}	0.53
	<i>E. pandellei</i> n = 6	FAI	0.2 _{1,4}	0.89	2.96 _{1,4}	0.16	0.68 _{1,4}	0.46	2.84 _{1,4}	0.17
		PCI	2.47 _{1,4}	0.19	0.29 _{1,4}	0.62	0.33 _{1,4}	0.60	0.48 _{1,4}	0.53
Stigmas	Emasculated n = 27	FAI	1.27 _{1,25}	0.27	0.15 _{1,25}	0.70	1.31 _{1,25}	0.26	5.96 _{1,25}	0.02 (+)
		PCI	0.81 _{1,25}	0.38	0 _{1,25}	0.99	0.8 _{1,25}	0.38	0.73 _{1,25}	0.4
	Control n = 27	FAI	0.10 _{1,25}	0.75	2.1 _{1,25}	0.16	0.09 _{1,25}	0.77	1.24 _{1,25}	0.28
		PCI	0 _{1,25}	0.95	1.39 _{1,25}	0.25	0.01 _{1,25}	0.94	1.26 _{1,25}	0.27

Abbreviations: FAI = Floral availability index; PCI = Patch closeness index. Sample sizes (n) correspond to the number of patches included in the analyses. Bold values correspond to significant *P* value (< 0.05). Trends are shown in parentheses. Degrees of freedom are shown in subscript.

We found a significant non-linear negative relationship between CP proportions in stigmatic pollen loads of emasculated flowers and *R. ferrugineum* visitor density (Fig. 4b; $y = 0.8425x^{-0.0562}$, $F_{2,25} = 404.5$, $P < 0.0001$) while CP, HP and total pollen number were not significantly affected ($F_{1,25} = 0.56$, $P = 0.46$; $F_{1,25} = 0.99$, $P = 0.33$ and $F_{1,25} = 0.65$, $P = 0.43$, respectively). Pollen loads from control flowers were not related to visitor density ($F_{1,25} = 0.08$, $P = 0.78$; $F_{1,25} = 0.03$, $P = 0.87$; $F_{1,25} = 0.08$, $P = 0.78$ and $F_{1,25} = 0.9$, $P = 0.35$ for CP, HP and total pollen quantity and CP proportion, respectively).

Interestingly, we found a significant positive relationship between the proportion of CP in stigmatic pollen loads from emasculated flowers and that in overall visitor and total *Bombus* pollen loads ($F_{1,15} = 5.64$, $P = 0.03$ and $F_{1,14} = 5.08$, $P = 0.04$). No relationship

existed between *B. soroensis* pollen loads and other *Bombus* ($F_{1,15} = 0.55$, $P = 0.48$; $F_{1,14} = 1.71$, $P = 0.21$), mainly due to the lower sample size of these insects. CP proportion in stigmatic pollen loads from control flowers and insect pollen loads were not related ($F_{1,15} = 0.68$, $P = 0.42$; $F_{1,14} = 2.27$, $P = 0.15$; $F_{1,14} = 2.58$, $P = 0.15$; $F_{1,14} = 2.56$, $P = 0.14$ for overall visitor, total *Bombus*, *B. soroensis* and other *Bombus*, respectively).

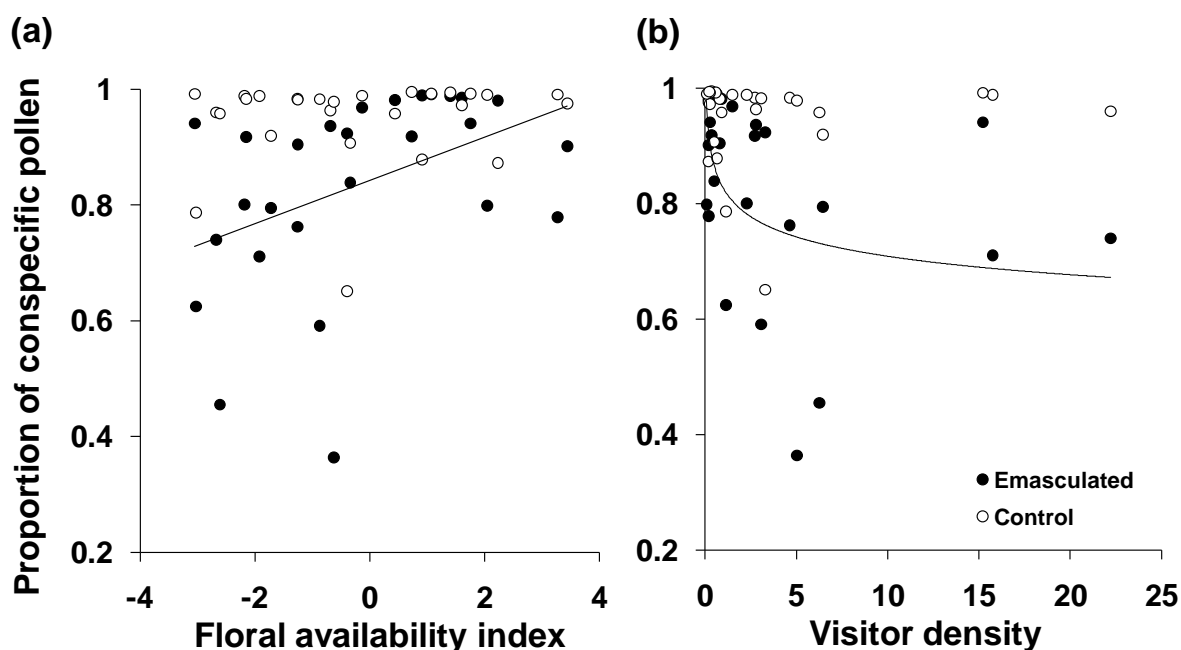


Figure 4 Relationship between a) *R. ferrugineum* floral availability index and b) *R. ferrugineum* visitor density and conspecific pollen proportion in stigmatic pollen loads from emasculated and control flowers. Significant relationships are shown as full lines (emasculated treatment, see text and Table 3 for details)

Although coefficients of variation in total stigmatic pollen loads were high both for emasculated and control flowers, they were higher in the low (CV= 61.5% and 78.9%) than in the high mate availability patches (CV = 48.7% and 42.6% for emasculated and control flowers respectively). Accordingly, the CV of pollen limitation (pollen:ovule ratios) was higher in the low (CV = 78.9% and 59%) than in the high mate availability patches (CV = 45.5% and 53.3% for emasculated and control treatments respectively).

DISCUSSION

Pollen deposition, a determining factor in pollen limitation, depends on mate and pollinator availabilities (Campbell and Husband 2007) as well as pollinator assemblage and foraging

behaviour (Geber and Moeller 2006). The contribution of these factors to selective pressures on the mating system of self-compatible species has rarely been investigated in natural populations (Moeller 2004; Eckert et al. 2010). Overall, our study showed that both conspecific plant and pollinator availabilities may restrict pollen transfer resulting in pollen limitation which is alleviated by self-pollination. Our results suggest that the mass-flowering habit of the shrub may compensate for plant isolation in the landscape through pollinator monopolization resulting in high proportion of CP transported and deposited on stigmas.

In self-compatible species, analyses of stigmatic pollen loads from emasculated flowers assess the actual quantity and quality (proportion of CP versus HP) of pollen delivery by pollinators (Kalisz and Vogler 2003). Here, we found evidence for low deposition of CP by pollinators both in the low and high mate availability patches resulting in a mean pollen limitation of 53% in emasculated flowers. Moreover, pollen limitation may be underestimated since not all pollen grains deposited on stigmas necessarily fertilize ovules. Despite low pollen loads deposited by pollinators, stigmatic pollen loads were almost pure since they were mainly composed of CP. Low HP deposition was also previously recorded (Feldman 2008; Jakobsson et al. 2008; Morales and Traveset 2008). Pollen transfer to stigmas depends on pollinator constancy (Chittka et al. 1999), the placement of pollen on the pollinator's body (Armbruster et al. 1994; Pauw 2006), the pollinator's grooming activity (Harder 1990) and the number of pollen grains transferred to the stigmas of the target species (Jakobsson et al. 2008; Morales and Traveset 2008). Interestingly, we found lower HP deposition on control stigmas where CP deposition is enhanced suggesting that self-CP loads (likely deposited prior to HP in this protandrous species) may prevent HP adherence to stigmas. Moreover, we evidenced a significant relationship between CP proportion in pollen loads of insects and stigmatic pollen loads of emasculated flowers. Note that stigmatic pollen loads were purer (83.5% of CP) than total flower visitor pollen loads (68% of CP) but corresponded approximately to pollen loads carried by the most abundant pollinator, *B. soroensis* (92.8%). This finding suggests that *B. soroensis* may be mainly responsible for *R. ferrugineum* pollen transfer since it was the most abundant non-cheating flower visitor and carried almost pure pollen loads in high quantity suggesting constancy. Moreover, *B. soroensis* was the only insect observed buzzing in the flowers to release pollen from the poricidal anthers of the target species (CELD personal observation). As previously shown by Escaravage and Wagner (2004), Diptera such as *E. pandellei* may be less efficient pollen vectors in *R. ferrugineum* since they carry lower pollen loads with a mix of CP and HP and are less abundant. *Empis* are smaller and less hairy than *Bombus* resulting in the lowest pollen loads recorded. Other *Bombus* species' pollen

loads suggest that they may be less dependent on *R. ferrugineum* floral resources and/ or exhibit less constancy likely providing lower pollination services in terms of quantity and quality due to their lower abundance and the higher proportion of HP in their pollen loads.

All along the plant spatial pattern gradient, self-pollen deposition enhances stigmatic CP loads to match up to the number of available ovules and alleviates pollen limitation in control flowers both through an increase in CP and a decrease in HP. If self-pollination result in the same seed set as cross pollination, in the case of no seed discounting, the shrub would largely benefit from reproductive assurance (Herlihy and Eckert 2002; Kalisz and Vogler 2003; Kennedy and Elle 2008). However, inbreeding may lead to a decrease in individual fitness (Knight 1799), a loss of genetic variation (Hirayama et al. 2007) and consequently an increased risk of population extinction (Lennartsson 2002). Finally, stigmatic pollen loads of unmanipulated flowers were not related to pollinator pollen loads suggesting an important role of self-pollination in the pollination of the shrub. Mate and pollinator availabilities had no effect on stigmatic pollen loads and pollen limitation in unmanipulated flowers which buffer each of these limiting factors through autonomous self-pollination. To our knowledge, this is the first study linking the pollen loads transported by pollinators, deposited on stigmas and the contribution of self-pollination to pollen receipt.

Since plant isolation (Duncan et al. 2004; Feldman 2008) as well as pollinator failure (Kalisz et al. 2004) reduces outcross pollen receipt, both mate and pollinator limitations may lead to the low CP loads and pollen limitation recorded in emasculated flowers along the plant spatial pattern gradient. Plant mate and pollinator availabilities often co-varied since pollinators are known to be attracted to large and dense populations (Kunin 1997; Cheptou and Avendano 2006) suggesting that high pollinator availability occurring in poor mate populations is not likely in natural conditions. However, mate and pollinator limitations may occur independently, for instance, in the case of saturating response of pollinators to plant density resulting in fewer flower visits in higher-density patches (Feldman 2006) or in the case of stronger response of plants (or pollinators) to perturbations. In this study, we found an increase in flower visitor abundance with increasing *R. ferrugineum* floral availability. However, due to the mass-flowering habit of the shrub, visitors were diluted among the myriad of flowers in large and dense patches resulting in reduced visitor density in those patches as well as reduced visitation rate per flower (Delmas et al. unpublished data). Other studies have found similar patterns (Campbell and Husband 2007; Wagenius and Lyon 2010). Here, reduced mate availability (low density and low floral display size and density) occurred with high pollinator availability and inversely, high mate availability occurred with reduced

pollinator availability providing us the opportunity to separate mate versus pollinator effects on pollen loads and pollen limitation.

In large and dense patches, stigmas from emasculated flowers on average received low pollen loads with a high proportion of CP. Pollen load quantity was highly variable among shrubs whereas the variability in quality (proportion of CP) was lower. These results suggest that pollinator rather than mate availability limit pollen receipt according to the reduced visitor density found in these patches of high mate availability. Moreover, the low visitor density found in large and dense patches is related to enhanced quantity and proportion of CP carried by each insect. Our results corroborate the hypothetical pattern presented by Eckert et al. (2010) in the case of low pollinator availability occurring with high mate availability. In *R. ferrugineum*, the mass-flowering habit aggregating several thousand flowers over a single square meter is clearly a trait aggravating pollen limitation in large and dense patches.

In small and sparse patches, we found levels of limitation in pollination services provided similar to that of large and dense patches despite the higher availability in flower visitors (higher visitor density) recorded. Indeed, the increase in visitor density did not result in an increase in CP quantity deposition on stigmas from emasculated flowers. The reduced CP availability and the higher pollinator density result in (i) the dilution of CP between flower visitors (each insect carries a lower CP load at higher visitor density), (ii) an increase in HP carried by the most abundant pollinator (*B. soroensis*), (iii) a reduced proportion of CP carried and deposited by pollinators and (iv) in higher variation in pollen loads and pollen limitation among pollinators and shrubs. Pollen receipt and subsequent pollen limitation has been shown to be highly variable among individuals due to conspecific and heterospecific floral neighborhood densities (Jakobsson et al. 2009) which are both highly heterogeneous in small and sparse patches of *R. ferrugineum*. Interestingly, CP proportion was higher in insect pollen loads than shrub coverage proportion. Particularly, even at shrub cover less than 5% in heathland patches, pollinators carried more than 40% of CP (80% for *B. soroensis*) and deposited more than 40% of CP on stigmas. Limitation in pollen transfer (emasculated flowers) did not increase with plant isolation as usually expected (Duncan et al. 2004). This pattern likely results from the disproportionate attraction exerted by the mass-flowering shrub on flower visitors even if they tend to switch between species more often in small and sparse patches. Thus, the mass-flowering strategy of the species associated to the constancy of *B. soroensis* is clearly an efficient way to alleviate or compensate for the negative impacts of plant isolation. Once a shrub is encountered, its mass-flowering habit leads pollinators to visit numerous flowers in the same foraging bout as an optimal strategy (Pyke 1984) resulting in

higher CP proportion compared to the proportion of *R. ferrugineum* coverage per patch and may rescue isolated shrubs from competitive interactions through HP deposition (de Jager et al. 2011). However, this behavior may result in high rate of geitonogamous pollination – i.e. fertilization by pollen from the same individual (Eckert 2000). High pollen load deposition with a low proportion of CP should occur in the case of low mate and high pollinator availabilities as suggested by Eckert et al. (2010). Our results, highlighting low but relatively pure CP loads, corroborate the hypothesis of mate limitation associated to abundant constant or specialized pollinators.

Enhancement of patch closeness led to a higher quantity of CP in insect pollen loads most probably resulting from reduced travelling time between patches. An increase in patch isolation may lead pollinators to forage in the surrounding matrix resulting in the loss of CP to foreign stigmas (Schulke and Waser 2001). Patch isolation may result in diminished pollen transfer and subsequent low genetic diversity (Ghazoul 2005).

The experimental emasculation of flowers performed in this study reveals that pollinator limitation results in a reduced quantity of pollination services while mate limitation results in reduction of both quantity and quality of pollination services. No optimal level for the pollination of this mass-flowering species has been detected since the gradients of mate and pollinator availabilities exert cross-pressures on pollen loads resulting in continuous pollen transfer limitation. Our approach, integrating natural gradients of plant and pollinator availabilities, constitutes a unique opportunity to evaluate their relative contributions to pollen transfer and pollen limitation and provides new insights to understand the impact of human disturbance on pollination systems.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank R. Hamdan and V. Lapido for help with data collection. We thank P. Rasmont for carrying out previous identification of bumblebees used as a reference collection and C. Daugeron for Empididae identifications. We also gratefully acknowledge the helpful comments provided by B. Schatz on the manuscript and statistical advices provided by J-B Ferdy. Funding from La Fondation Pour la Recherche sur la Biodiversité (COMBIO project N° AAP-IN-2009-013) is acknowledged. This work was funded by a French Ministry grant to CELD. This work is part of the "Laboratoire d'Excellence (LABEX)" entitled TULIP (ANR -10-LABX-41).

REFERENCES

- Aguilar R, Ashworth L, Galetto L, Aizen MA (2006) Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecol. Lett.* 9:968-980
- Armbruster WS, Edwards ME, Debevec EM (1994) Floral character displacement generates assemblage structure of Western Australian triggerplants (*Stylidium*). *Ecology* 75:315-329
- Augspurger CK (1980) Mass-flowering of a tropical shrub (*Hybanthus prunifolius*): influence on pollinator attraction and movement. *Evolution* 34:475-488
- Augspurger CK (1981) Reproductive synchrony of a tropical shrub: experimental studies on effects of pollinators and seed predators in *Hybanthus prunifolius* (Violaceae). *Ecology* 62:775-788
- Bjerknes AL, Totland O, Hegland SJ, Nielsen A (2007) Do alien plant invasions really affect pollination success in native plant species? *Biol. Conserv.* 138:1-12
- Campbell LG, Husband BC (2007) Small populations are mate-poor but pollinator-rich in a rare, self-incompatible plant, *Hymenoxys herbacea* (Asteraceae). *New Phytol.* 174:915-925
- Cheptou PO, Avendano LG (2006) Pollination processes and the Allee effect in highly fragmented populations: consequences for the mating system in urban environments. *New Phytol.* 172:774-783
- Chittka L, Thomson JD, Waser NM (1999) Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften* 86:361-377
- Dafni A (1992) *Pollination Ecology: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, UK
- Dauber J et al. (2010) Effects of patch size and density on flower visitation and seed set of wild plants: a pan-European approach. *J. Ecol.* 98:188-196
- de Jager ML, Dreyer LL, Ellis AG (2011) Do pollinators influence the assembly of flower colours within plant communities? *Oecologia* 166:543-553
- Dominguez CA, Abarca CA, Eguiarte LE, Molina-Freaner F (2005) Local genetic differentiation among populations of the mass-flowering tropical shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *New Phytol.* 166:663-672
- Duncan DH, Nicotra AB, Wood JT, Cunningham SA (2004) Plant isolation reduces outcross pollen receipt in a partially self-compatible herb. *J. Ecol.* 92:977-985
- Eckert CG (2000) Contributions of autogamy and geitonogamy to self-fertilization in a mass-flowering, clonal plant. *Ecology* 81:532-542
- Eckert CG et al. (2010) Plant mating systems in a changing world. *Trends Ecol. Evol.* 25:35-43
- Escaravage N, Pornon A, Doche B, TillBottraud I (1997) Breeding system in an alpine species: *Rhododendron ferrugineum* L (Ericaceae) in the French northern Alps. *Can. J. Bot.* 75:736-743
- Escaravage N, Wagner J (2004) Pollination effectiveness and pollen dispersal in a *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) population. *Plant Biol.* 6:606-615
- Feldman TS (2006) Pollinator aggregative and functional responses to flower density: does pollinator response to patches of plants accelerate at low-densities? *Oikos* 115:128-140
- Feldman TS (2008) The plot thickens: does low density affect visitation and reproductive success in a perennial herb, and are these effects altered in the presence of a co-flowering species? *Oecologia* 156:807-817
- Fontaine C, Collin CL, Dajoz I (2008) Generalist foraging of pollinators: diet expansion at high density. *J. Ecol.* 96:1002-1010

- Geber MA, Moeller DA (2006) Pollinator responses to plant communities and implications for reproductive character evolution. In: Harder LD, Barrett SCH (eds) *The ecology and evolution of flowers*. Oxford University Press, pp 102-119
- Ghazoul J (2005) Pollen and seed dispersal among dispersed plants. *Biol. Rev.* 80:413-443
- Goodwillie C, Kalisz S, Eckert CG (2005) The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:47-79
- Harder LD (1990) Behavioural responses by bumble bees to variation in pollen availability. *Oecologia* 85:41-47
- Hegland SJ, Nielsen A, Lazaro A, Bjerknes AL, Totland O (2009) How does climate warming affect plant-pollinator interactions? *Ecol. Lett.* 12:184-195
- Herlihy CR, Eckert CG (2002) Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilizing plant. *Nature* 416:320-323
- Hirayama K, Ishida K, Setsuko S, Tomaru N (2007) Reduced seed production, inbreeding, and pollen shortage in a small population of a threatened tree, *Magnolia stellata*. *Biol. Conserv.* 136:315-323
- Holsinger KE (1996) Pollination biology and the evolution of mating systems in flowering plants. In: *Evolutionary Biology*, Vol 29, vol 29, pp 107-149
- Jakobsson A, Lazaro A, Totland O (2009) Relationships between the floral neighborhood and individual pollen limitation in two self-incompatible herbs. *Oecologia* 160:707-719
- Jakobsson A, Padron B, Traveset A (2008) Pollen transfer from invasive *Carpobrotus spp.* to natives - A study of pollinator behaviour and reproduction success. *Biol. Conserv.* 141:136-145
- Kalisz S, Vogler DW (2003) Benefits of autonomous selfing under unpredictable pollinator environments. *Ecology* 84:2928-2942
- Kalisz S, Vogler DW, Hanley KM (2004) Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature* 430:884-887
- Kearns CA, Inouye DW (1993) *Techniques for pollination biologists*. Niwot, CO: University Press of Colorado
- Kennedy BF, Elle E (2008) The reproductive assurance benefit of selfing: importance of flower size and population size. *Oecologia* 155:469-477
- Knight T (1799) Experiments on the fecundation of vegetables. *Philos Trans R Soc Lond* 89:195-204
- Knight TM (2003) Floral density, pollen limitation, and reproductive success in *Trillium grandiflorum*. *Oecologia* 137:557-563
- Kunin WE (1997) Population size and density effects in pollination: Pollinator foraging and plant reproductive success in experimental arrays of *Brassica kaber*. *J. Ecol.* 85:225-234
- Lennartsson T (2002) Extinction thresholds and disrupted plant-pollinator interactions in fragmented plant populations. *Ecology* 83:3060-3072
- McCullagh P, Nelder JA (1989) *Generalized Linear Models*, London: Chapman & Hall
- Moeller DA (2004) Facilitative interactions among plants via shared pollinators. *Ecology* 85:3289-3301
- Morales CL, Traveset A (2008) Interspecific pollen transfer: Magnitude, prevalence and consequences for plant fitness. *Crit. Rev. Plant Sci.* 27:221-238
- Neiland MRM, Wilcock CC (1995) Maximisation of reproductive success by European Orchidaceae under conditions of infrequent pollination. *Protoplasma* 187:39-48
- Ozenda P (1985) *La végétation de la chaîne alpine dans l'espace montagnard européen*. Masson, Paris
- Pauw A (2006) Floral syndromes accurately predict pollination by a specialized oil-collecting bee (*Rediviva peringueyi*, Melittidae) in a guild of South African orchids (Coryciinae). *Am. J. Bot.* 93:917-926
- Pornon A, Escaravage N, Till-Bottraud I, Doche B (1997) Variation of reproductive traits in *Rhododendron ferrugineum* L (Ericaceae) populations along a successional gradient. *Plant Ecol.* 130:1-11
- Pyke GH (1984) Optimal foraging theory: a critical review. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*:523-575
- Rasmont P (1988) *Monographie écologique et zoogéographique des Bourdons de France et de Belgique (Hymenoptera, Apidae, Bombinae)*. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux.
- Schulke B, Waser NM (2001) Long-distance pollinator flights and pollen dispersal between populations of *Delphinium nuttallianum*. *Oecologia* 127:239-245
- Sih A, Baltus MS (1987) Patch size, pollinator behavior, and pollinator limitation in catnip. *Ecology* 68:1679-1690
- Thomson JD (1980) A simulation of optimal foraging: the nuts and bolts approach. *Am Biol Teacher* 42:528-533
- Wagenius S, Lyon SP (2010) Reproduction of *Echinacea angustifolia* in fragmented prairie is pollen-limited but not pollinator-limited. *Ecology* 91:733-742
- Waites AR, Agren J (2004) Pollinator visitation, stigmatic pollen loads and among-population variation in seed set in *Lythrum salicaria*. *J. Ecol.* 92:512-526
- Wilcock C, Neiland R (2002) Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends Plant Sci.* 7:270-277

ONLINE RESOURCES

Online resource 1. PCA statistics. Five principal components that explained all of the variance in heterogeneity of the original 5 spatial variables. Only indexes 1-2 (in bold) were included in further analyses as they had eigenvalues greater than 1 (i.e., the index explained more variance than any one of the spatial variables).

Index number	Eigenvalue	% Total variance
1	3.36982833	0.67396567
2	0.97389669	0.19477934
3	0.36948125	0.07389625
4	0.21887915	0.04377583
5	0.06791458	0.01358292

Online resource 2. PCA index loadings. Correlations between the two principal components used in analyses and the original spatial variables.

Scale	Spatial variables	Index 1	Index 2
<i>R. ferrugineum</i> individual scale	Individual floral display	0.81	-0.26
	Isolation	-0.88	-0.24
Patch scale	<i>R. ferrugineum</i> floral display density	0.95	0.14
	Total <i>R. ferrugineum</i> floral display size	0.92	0.26
	Heathland patch closeness	0.42	-0.87

Bold values represent significant correlations ($p < 0.05$)

Online resource 3. List of *Bombus* species (Hymenoptera) collected on *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) for external pollen load analyses.

<i>Bombus (Bombus) lucorum</i> (L.)
<i>Bombus (Kallobombus) soroensis</i> (Fabricius) <i>ssp. lectitatus</i> (Kruseman)
<i>Bombus (Psithyrus) rupestris</i> (Fabricius) <i>ssp. vasco</i> (Lepelletier)
<i>Bombus (Pyrobombus) monticola</i> (Smith) <i>ssp. rondoui</i> (Vogt)
<i>Bombus (Rhodobombus) mesomelas</i> (Gerstaecker)
<i>Bombus (Confusibombus) confusus</i> (Schenck)
<i>Bombus (Thoracobombus) ruderarius</i> (Müller) <i>ssp. ruderarius</i> (Lepelletier)
<i>Bombus (Melanobombus) lapidarius</i> (L.)
<i>Bombus (Megabombus) hortorum</i> (L.)
<i>Bombus (Alpigenobombus) wurfleini</i> (Radoszkowski) <i>ssp. pyrenaicus</i> (Vogt)*

*Nectar robber (not included in pollen load analyses)

CHAPITRE 3

Isolation and characterization of microsatellite loci in
Rhododendron ferrugineum (Ericaceae) using
pyrosequencing technology

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE
LOCI IN *RHODODENDRON FERRUGINEUM* (ERICACEAE) USING
PYROSEQUENCING TECHNOLOGY¹**

CHLOÉ E. L. DELMAS^{2,3,4}, EMELINE LHUILLIER³, ANDRÉ PORNON^{2,3},
AND NATHALIE ESCARAVAGE^{2,3}

²University Toulouse III Paul Sabatier, Laboratory Evolution & Diversite Biologique EDB, F-31062 Toulouse, France;
and ³CNRS, EDB, UMR 5174, F-31062 Toulouse, France

- *Premise of the study:* Microsatellite primers were developed for *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) to evaluate genetic diversity, population genetic structure, and mating system of this self-compatible species.
- *Methods and Results:* The new-generation 454 FLX Titanium pyrosequencing technology was used to isolate 102 novel microsatellite loci. Two multiplex PCR sets were optimized to genotype nine polymorphic microsatellite loci. The level of genetic diversity was assessed in two populations from the Pyrenees (France). The mean number of alleles per locus ranged from 1.5 to 7. The mean observed and expected heterozygosities ranged from 0 to 0.76 and from 0.03 to 0.66, respectively. Cross-species amplification was successful for 13 other *Rhododendron* species and two additional genera of Ericaceae, with an average of seven pairs of primers amplifying per species.
- *Conclusions:* These markers will facilitate further studies on the evolutionary history of the large Ericaceae family and *Rhododendron* in particular.

Key words: Ericaceae; microsatellite marker; population genetics; pyrosequencing; *Rhododendron*.

Rhododendron L. (Ericaceae) is a worldwide-distributed genus comprising more than 1 000 species of evergreen, semideciduous, and deciduous shrubs and trees. In France, heathland communities dominated and structured by the self-compatible shrub *Rhododendron ferrugineum* L. are widely and patchily distributed in the Alps and the Pyrenees. *Rhododendron ferrugineum* heathlands range from large and dense patches to isolated shrubs between 1 500 and 2 200 m a.s.l. on northwest-facing slopes. For sexually reproducing plant species, habitat fragmentation may affect the pollinator community and availability of mates, leading to important consequences for pollen flow, mating system, and seed production. Consequently, fragmentation may result in genetic erosion and decreasing offspring fitness and population viability (Young et al., 1996). However, the effect of plant spatial pattern on selfing and outcrossing and on the subsequent genetic diversity is still poorly understood. *Rhododendron ferrugineum* has a massive floral display consisting of numerous inflorescences of 5–22 red tubular flowers (Escaravage et al., 1997). This evergreen shrub reproduces both sexually

(Escaravage et al., 1997) and vegetatively by layering (Pornon et al., 2000). Here we report the isolation and characterization of nine polymorphic microsatellite loci that will be used to assess the mating system, genetic diversity, and population genetic structure of *R. ferrugineum* growing in various heathland spatial patterns.

METHODS AND RESULTS

Total genomic DNA was extracted from 20 mg of lyophilized leaf tissue using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. The extract was purified using standard phenol/chloroform method, ethanol precipitated and resuspended in buffer AE (Qiagen) to obtain a concentration of 134 ng/μl. Ratios of light absorbance at 260/280 nm and at 260/230 nm were determined to be 1.80 and 0.63, respectively, using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Peqlab, Erlangen, Germany). Production and pyrosequencing of enriched DNA libraries were carried out by Genoscreen (Lille, France) and are fully described in Martin et al. (2010). Genomic DNA was digested with *RsaI* (Fermentas, Saint-Rémy-lès-Chevreuse, France) for 1 hour at 37°C, according to the manufacturer's instructions and ligated to standard adapters. After purification on a Nucleofast PCR plate (Macherey-Nagel, Hoerd, France), ligated DNA was hybridized to eight Biotin-labeled oligonucleotides corresponding to eight targeted microsatellite motifs [(AG)₁₀, (AC)₁₀, (AAC)₈, (AGG)₈, (ACG)₈, (AAG)₈, (ACAT)₆, and (ATCT)₆]. The resulting enriched DNA was amplified using primers corresponding to adapters. A total of 5 μg of each purified enriched libraries was used in the 454 FLX Titanium (Roche Applied Science, Meylan, France) library preparation following the manufacturer's protocols and quality control steps. Emulsion PCR, sequencing, and analytical processing such as base calling were then performed without modifications according to the GS-FLX protocol for Titanium series. The resulting sequences were subsequently sorted and selected using the open access program QDD (Meglecz et al., 2010). A total of 102 concatenated sequences longer than 80 bp contained microsatellite motifs with at least four repeats and tandem-repetition-free flanking regions.

We tested the amplification of the 102 sequences in separate PCR reactions. PCRs were performed in a 25-μL mix containing 2× QIAGEN Multiplex PCR

¹Manuscript received 27 December 2010; revision accepted 12 January 2011.

The authors thank F. Forest and E. Kapinos (Jodrell Laboratory at the Royal Botanic Gardens, Kew) for providing *Rhododendron* species DNA. We are also grateful to A. Khimoun and P-J. Malé for helpful advice. This study has been supported by a research program of the "Fondation Pour la Recherche sur la Biodiversité" (COMBIO project N° AAP-IN-2009-013) and by a grant from the French National Institute for Agricultural Research (INRA), AIP BioRessources EcoMicro.

⁴Author for correspondence: delmas@cict.fr

TABLE 1. Characteristics of nine polymorphic microsatellite markers in *Rhododendron ferrugineum*.

Locus	Repeat motif (pyrosequenced allele)	Size range (bp)	5' dye	Primer sequences (5'–3')	Multiplex markers set	GenBank Accession No.
RF6P2	(TCTG) ₄	208–228	Yakima Yellow	F: CAGCGTGATAAAATTGAGGGG R: TACACCGTTCTGCCATTTCAG	2	HQ822279
RF14P3	(GGA) ₅	332–338	6FAM	F: ACATAGAGCATTTGGCCGAC R: GGAGTCGAGTGGTTCGTT	1	HQ822277
RF38P1	(TCC) ₄	226–235	Atto565	F: TCAATCGGACATTATTACCTTG R: AGGATGAGCTGTGAGTCGGT	1	HQ822281
RF41P1	(TC) ₉	184–234	Atto550	F: TCCAAGTGGTTATGTAATTCTATCG R: CTATGCTTCGGCAAAAGGAA	1	HQ822282
RF46P2	(CTC) ₆	161–164	6FAM	F: CAGAGGCCTACACTTCTGCC R: ACAGGAAGGTTAGGAGGGGA	2	HQ822276
RF47P1	(TC) ₁₂	59–83	6FAM	F: CTCCTCGTCGTACACATTC R: CCATGCGCTTGATAGGTAG	1	HQ822280
RF56P1	(AC) ₆	73–85	Yakima Yellow	F: AATGTATTTATTGTCTTTATCCCCA R: CTTGAGGTGTGCAGCTTGA	2	HQ822283
RF74P1	(GA) ₁₃	152–182	Atto565	F: ATGCCACCAATCTATTGCC R: TTCTCTCCTGCACGCTTCT	2	HQ822278
RF81P1	(GA) ₁₁	140–154	Yakima Yellow	F: CGAAGGACCAACTGAAAAGG R: ACCATGGCCACTGTTTACC	1	HQ822275

Master Mix, 2.5 pmol of each primer, 1 µL of DNA and RNase-free water. The PCR program consisted of one step of initial denaturation at 95°C (15 min) followed by 40 cycles of denaturation at 95°C (30 s), annealing at 55°C (30 s), extension at 72°C (60 s) and ended with final extension at 72°C for 10 min. Forty-four of the 102 primer pairs produced clear amplicons of the expected size on agarose gels.

Among the 44 primer pairs, we chose a set of 24 markers for analysis on automated sequencers that minimized differences in annealing temperatures among primers and maximized the range of amplification product sizes using Multiplex Manager 1.1 (Holleley and Geerts, 2009) as done by Male et al. (2010 in Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al., 2010). In self-compatible and mass-flowering species like *R. ferrugineum*, levels of genetic diversity are often low due to selfing and geitonogamy (Eckert, 2000; Charlesworth, 2003). Consequently, to maximize the chance to isolate polymorphic microsatellite loci in the target self-compatible species, we performed two sets of tests. First, we tested the 24 primer pairs on a large spatial scale by genotyping seven individuals collected in three distant areas (42°51'N, 1°4'E; 42°48'N, 0°9'E; 42°46'N, 01°55'E) in the French Pyrenees ("PYR"). Nine of the 24 loci we examined were polymorphic in our sample. Second, we estimated polymorphism levels of these 9 loci by genotyping 62 individuals from two Pyrenean populations of *R. ferrugineum* about 150 km away from each other: Cirque de Campuls ("CirCam") and Camurac ("CAM"). For each individual sample, 20 mg of lyophilized leaf tissue was ground with two tungsten beads (diameter 3 mm) in 2 mL microtubes at 30 Hz for 90 s using TissueLyser II (Qiagen). DNA extractions were performed using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. PCR amplifications were carried out as described above but with fluorescent-labeled forward primers (Eurofins MWG Operon, Courtaboeuf, France). The dyes were chosen to minimize the number of electrophoresis runs to one (see Table 1). The 9 loci were coamplified in two independent PCR sets (see Table 1), and PCR products were pooled before electrophoresis. All of these loci were unambiguously sized using an ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with the 1200 LIZ GeneScan size standard and GENEMAPPER version 4.0 software. Polymorphism tests were realized by Genoscreen (Lille, France).

In the two populations, the levels of polymorphism, deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium (LD) between pairs of microsatellite loci, using 1000 permutations, were calculated using GENEPOP 4.0 (Raymond and Rousset, 1995). Mean allelic diversity varied from 1.5 to 7, and mean observed heterozygosity from 0 to 0.76 (see data per population in Table 2). One locus was monomorphic in "CAM" and another in the "CirCam" population. However, both loci were polymorphic at a larger scale ("PYR") allowing their use in population genetic studies of the self-compatible shrub (Table 2). Significant departures from HWE were detected in one locus in CAM and in two loci in CirCam (Table 2). Significant LD was discovered in one loci pair (RF47P1 vs. RF56P1). The sequences of the nine microsatellite loci have been deposited in GenBank (see Table 1 for their accession numbers).

Cross-species amplifications were tested on individuals from 13 *Rhododendron* species and two species from the Ericaceae family (*Vaccinium myrtillus* L. and *Erica scoparia* L.). Extractions and PCR conditions were identical to those described above and results are reported in Appendix 1 (successful amplification or not). Overall, three loci among the nine were amplified in all the tested species. At the species level, all loci were amplified in *Vaccinium myrtillus*, 8 loci in *Erica scoparia*, and 5 to 8 loci in the 13 *Rhododendron* species (listed in Appendix 2). However, further development on these loci should be performed to optimize PCR conditions for these 15 species.

CONCLUSIONS

This set of nine polymorphic microsatellites is adequate to further investigate the mating system and population genetic structure of *R. ferrugineum*, *Rhododendron* species, and the large Ericaceae family in general. More specifically, estimated rates of selfing and outcrossing, along with experimental pollination manipulations, might be used to understand the evolutionary responses of *R. ferrugineum* mating system to heathland fragmentation.

TABLE 2. Results of initial primer screening in *R. ferrugineum*. For each locus, the number of individuals analyzed (N), number of alleles observed (Na), mean values of observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity, significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (*) after correction for multiple tests (Sequential Bonferroni procedure; p < 0.01) are reported for two populations: CAM (Camurac 42°46'N, 01°55'E) and CirCam (Cirque de Campuls 42°51'N, 1°4'E). Individuals from three distant areas in the Pyrenees (PYR) were used to isolated polymorphic loci.

Locus	PYR (N = 7)		CAM (N = 31)		CirCam (N = 31)		
	Na	H _o	Na	H _e	Na	H _o	H _e
RF6P2	2	2	2	0.03	2	0.03	0.45*
RF14P3	2	2	0	0.06	1	0	0
RF38P1	3	3	0.06	0.06	2	0.06	0.06
RF41P1	5	3	0.65	0.62	3	0.45	0.41
RF46P2	2	1	0	0	2	0.03	0.03
RF47P1	5	4	0.35	0.38	3	0.45	0.64
RF56P1	2	2	0.77	0.47*	2	0.74	0.47*
RF74P1	6	7	0.71	0.69	7	0.68	0.63
RF81P1	2	3	0.26	0.23	3	0.42	0.40

LITERATURE CITED

- CHARLESWORTH, D. 2003. Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 358: 1051–1070.
- ECKERT, C. G. 2000. Contributions of autogamy and geitonogamy to self-fertilization in a mass-flowering, clonal plant. *Ecology* 81: 532–542.
- ESCARAVAGE, N., A. PORNON, B. DOCHE, AND I. TILLBOTTRAUD. 1997. Breeding system in an alpine species: *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) in the French northern Alps. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 75: 736–743.
- HOLLELEY, C., AND P. GEERTS. 2009. Multiplex Manager 1.0: A cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *BioTechniques* 46: 511–517.
- MARTIN, J. F., N. PECH, E. MEGLE CZ, S. FERREIRA, C. COSTEDOAT, V. DUBUT, T. MALAUSA, AND A. GILLES. 2010. Representativeness of microsatellite distributions in genomes, as revealed by 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics* 11: 560.
- MEGLE CZ, E., C. COSTEDOAT, V. DUBUT, A. GILLES, T. MALAUSA, N. PECH, AND J. F. MARTIN. 2010. QDD: A user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics* 26: 403–404.
- MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES PRIMER DEVELOPMENT CONSORTIUM, M. ANDRIS, G. I. ARADOTTIR, G. ARNAU, A. AUDZIJONYTE, E. C. BESS, F. BONADONNA, ET AL. 2010. Permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 June 2010–31 July 2010. *Molecular Ecology Resources* 10: 1106–1108.
- PORNON, A., N. ESCARAVAGE, P. THOMAS, AND P. TABERLET. 2000. Dynamics of genotypic structure in clonal *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) populations. *Molecular Ecology* 9: 1099–1111.
- RAYMOND, M., AND F. ROUSSET. 1995. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact test and ecumenism. *The Journal of Heredity* 86: 248–249.
- YOUNG, A., T. BOYLE, AND T. BROWN. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 413–418.

APPENDIX 1. Cross-species PCR tests for 9 microsatellite loci in 15 plant species. The tested species include 13 species of *Rhododendron*, and two species of the Ericaceae family: *Vaccinium myrtillus* and *Erica scoparia* (*n* individuals genotyped for each species). Amplification failure is indicated by a dash.

Locus	<i>Rhododendron sp.</i> (<i>n</i> = 1 per species)													Other Ericaceae	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	<i>V. myrtillus</i> (<i>n</i> = 11)	<i>E. scoparia</i> (<i>n</i> = 9)
RF6P2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RF14P3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RF38P1	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	+
RF41P1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
RF46P2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RF47P1	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+
RF56P1	+	—	+	+	—	—	+	—	—	+	+	+	—	+	+
RF74P1	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+
RF81P1	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	—	+	—	+	—

Rhododendron species DNA have been provided by the Royal Botanic Gardens, Kew (UK).

APPENDIX 2. Correspondence between *Rhododendron species* number and species names and the Kew Botanical Gardens accession number are listed below:

Species No	Family	Genus	Species	MWC	Hpe Accn No.
1	ERICACEAE	<i>Rhododendron</i>	<i>brachycarpum</i> G. Don subsp. <i>brachycarpum</i>	37945	1999-3968
2	ERICACEAE	<i>Rhododendron</i>	<i>hyperythrum</i> Hayata	37952	2000-210
3	ERICACEAE	<i>Rhododendron</i>	<i>luteum</i> Sweet	37954	2000-328
4	ERICACEAE	<i>Rhododendron</i>	<i>macrophyllum</i> D. Don ex G. Don	37955	1999-3902
5	ERICACEAE	<i>Rhododendron</i>	<i>mariesii</i> Hemsl. & E.H. Wilson	37956	1969-51058
6	ERICACEAE	<i>Rhododendron</i>	<i>molle</i> (Blume) G. Don	37957	1993-3627
7	ERICACEAE	<i>Rhododendron</i>	<i>wardii</i> W. W. Sm.	37967	1999-1018
8	ERICACEAE	<i>Rhododendron</i>	<i>canadense</i> (L.) Torr.	37975	1995-1918
9	ERICACEAE	<i>Rhododendron</i>	<i>occidentale</i> (Torr. & A. Gray) A. Gray	37977	1994-3271
10	ERICACEAE	<i>Rhododendron</i>	<i>vaseyi</i> A. Gray	37980	1994-3258
11	ERICACEAE	<i>Rhododendron</i>	<i>schlippenbachii</i> Maxim.	37982	1995-1921
12	ERICACEAE	<i>Rhododendron</i>	<i>camtschaticum</i> Pall.	37932	1979-603
13	ERICACEAE	<i>Rhododendron</i>	<i>edgeworthii</i> Hook.	37934	2009-1536

CHAPITRE 4

Mating system in mass-flowering plants: inferring the joint effects of pollinators, floral traits and floral resources in *Rhododendron* species

Mating system in mass-flowering plants: inferring the joint effects of pollinators, floral traits and floral resources in *Rhododendron* species

Delmas C.E.L.^{1,2*}, Escaravage N.^{1,2}, Cheptou P-O³, Charrier O.^{1,2}, Ruzafa S.⁴, Pornon A.^{1,2}

¹ *Université de Toulouse, ENFA; UMR 5174 EDB (Laboratoire Évolution & Diversité Biologique); 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France*

² *CNRS, Université Paul Sabatier; UMR 5174 EDB, F-31062 Toulouse, France*

³ *UMR 5175 CEFE – Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CNRS), 1919 Route de Mende, F-34293 Montpellier Cedex 05, France*

⁴ *GENOTOUL Platform, INRA chemin de Borde-Rouge BP52627 31326 Auzeville, France*

*Correspondence author: E-mail: chloedelmas@gmail.com

(soumis)

Summary

1. Plant and pollinator populations are increasingly affected by human disturbances, yet few studies have considered the consequences of pollinator *versus* mate availability reduction on plant reproductive traits. Here, we assess the joint effects of pollinators, plant spatial pattern and floral traits on the realized mating system of the mass-flowering and self-compatible shrub *Rhododendron ferrugineum*.

2. We used a gradient of *Rhododendron ferrugineum* floral display (n = 28 patches). We assessed flower visitation rate, floral traits (corolla size and herkogamy) and we experimentally dissected the pollination of *R. ferrugineum* in each patch by using four pollination parameters. Finally, we estimated realized multilocus outcrossing rates (progeny array analysis) using 12 polymorphic microsatellites.

3. We found that flower visitation rate decreased with increasing *R. ferrugineum* floral display indicating that the Allee effect is unlikely in this focal mass-flowering species. Pollen transfer was similar along the gradient of floral display suggesting that conspecific plant scarcity counterbalances the increase in visitation rate in small sparse patches. Reproductive assurance was higher in small sparse patches compared to large dense ones and alleviated pollen limitation mainly through pollinator-mediated self-pollination.

4. As a consequence, the multilocus outcrossing rate, (t_m , ranging from 0.2 to 0.8) decreased with decreasing *R. ferrugineum* floral display, which is probably due to higher facilitated self-pollen deposition in small sparse patches.

5. Autofertility and herkogamy were not significantly related to the floral display gradient suggesting that the variation in t_m recorded is a by-product of the pollination context.

6. *Synthesis.* Our results emphasize the importance of the ecological context at the community level (mate *versus* pollinator availability) in driving mating patterns. Conspecific plant scarcity resulted in an increase in seed production via selfing likely in response to pollinator-mediated autogamy. Whereas pollinator limitation in large dense patches resulted in the maintenance of a high outcrossing rate despite reduced seed production. In contrast, floral trait variation had no effect on the realized mating system. Our results suggest that neither mate limitation nor pollinator limitation lead to the selection of greater autonomous selfing ability.

Key-words: Allee effect, autofertility, herkogamy, mixed-mating system, outcrossing rate, pollen limitation, reproductive assurance, visitation rate.

INTRODUCTION

The evolution of mating systems in flowering plants relies on genetic factors that affect the transmission of genes from generation to generation (Knight, 1799, Fisher, 1941) and on ecological factors that influence the relative amount of self *versus* outcross pollen reaching the stigmas (Lloyd, 1992, Holsinger, 1996). Among the genetic factors, inbreeding depression generally reduces selfed progeny fitness (Charlesworth & Charlesworth, 1987). Of the ecological factors determinant for plant mating systems, pollination failure has long been proposed as exerting a strong selective pressure on the evolution of selfing (Darwin, 1876). Because plants are sessile, they require pollen vectors to ensure the transfer of male gametes between individuals. Due to this fundamental dependence, variable pollination environments leading to unpredictable outcross pollen receipt may favor self-fertilization in hermaphroditic self-compatible species (Lloyd, 1992, Herlihy & Eckert, 2002, Kalisz *et al.*, 2004). Autonomous self-fertilization may ensure the production of seeds when pollinators and/or potential mates are scarce and gives a selective advantage to selfers in pollen-limited environments, i.e. reproductive assurance (Jain, 1976, Lloyd, 1979, Lloyd, 1992). More specifically, the reproductive assurance hypothesis has been proposed by Baker (1955, 1967) to be advantageous in colonizing populations where pollinators or partners for mating are scarce (Cheptou, 2011). Plant and pollinator populations being increasingly affected by human disturbances, investigating the ecological and evolutionary consequences of pollination failure on plant populations may provide new insights into the understanding of plant mating system evolution (Eckert *et al.*, 2010).

Pollination failure occurs when too few or low quality pollen grains are deposited on stigmas (Knight *et al.*, 2005). Pollinator and mate limitations may have different ecological and evolutionary consequences on plant mating systems albeit these two components of pollen limitation are often confounded (Cheptou, 2011).

First, pollinator limitation caused by low pollinator availability (Harder & Barrett, 1995, Kunin, 1997, Dauber *et al.*, 2010) or pollinator decline (Potts *et al.*, 2010) may reduce the quantity of conspecific pollen deposited on stigmas (Aizen & Feinsinger, 1994, Aizen & Feinsinger, 2003) and lead to plants competing for pollinators. As a consequence, pollination is expected to be negatively related to plant density and the Allee effect is unlikely. When pollinator limitation resulted from intraspecific competition, the maintenance of predominant outcrossing through selection on attractive structures and floral life span could be possible because these traits improve success in intraspecific competition for pollinator services

(Eckert *et al.*, 2010). When pollinator limitation is severe or associated to mate limitation, selfing is likely to be selected (via the evolution of floral traits allowing autonomous self-pollination and providing reproductive assurance) to cope with the failure of pollen transfer (Lloyd, 1992).

Second, under mate limitation, both pollen quality and quantity are likely to limit seed production (Brys *et al.*, 2004, Duncan *et al.*, 2004, Aizen & Harder, 2007). Low pollen quality deposition resulting from the scarcity of conspecific plants includes related-pollen for self-incompatible species and heterospecific pollen grains (Wilcock & Neiland, 2002). Under mate limitation, pollination is expected to be positively related to plant density, thus creating the conditions necessary for the Allee effect to occur (Groom, 1998, Cheptou & Avendano, 2006). However, reduced mate availability, caused for example by human disturbance reducing the size and density of plant populations and increasing plant isolation may have various ecological and evolutionary consequences. While pollinator limitation is expected to mainly favor autonomous selfing, other modes of selfing may contribute to seed production when only mates are scarce: selfing occurring among flowers within an individual plant (geitonogamy) and within flower selfing facilitated by pollinator's foraging behavior (Goodwillie *et al.*, 2005, Barrett & Case, 2006, Vaughton & Ramsey, 2010). Geitonogamy depends on the number of simultaneously open flowers and on the pattern of pollinator movements and is very likely in mass-flowering plants (Harder & Barrett, 1995, Eckert, 2000, Karron *et al.*, 2004). Since facilitated selfing and geitonogamy requires the same plant attributes as outcrossing to maximize pollinator attraction, high selfing rates may not always be associated with an increase in the ability to spontaneously self-pollinate (e.g. reduced herkogamy, small flowers). Under mate limitation, all selfing modes can theoretically provide reproductive assurance if they contribute to ensuring seed production (Goodwillie *et al.*, 2005).

Therefore, the realized mating system is driven by the pollination context (plant and pollinator availabilities, pollinator foraging behavior) and floral traits such as herkogamy, dichogamy and flower size (Holsinger, 1996). Moreover, post-pollination processes such as self-incompatibility or early inbreeding depression are the last factors influencing the production of seeds (Husband & Schemske, 1996). To our knowledge, no study has jointly estimated the effects of pollinator activity and plant spatial distribution on pollination, floral traits and realized mating system of a focal species. Analyzing such factors is a determinant step towards a better integration of the factors influencing mating patterns.

The species studied here, *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae), is a self-compatible, mass-flowering shrub. *Rhododendron ferrugineum* patches present a broad range of size, density and floral display (from large dense to small sparse patches). We assessed plant spatial distribution per patch by estimating total *R. ferrugineum* floral display per patch. In order to examine potential mating system variation and to disentangle the factors responsible for such variation, we used pollination, floral and mating system analyses. Floral manipulations allow the assessment of different pollination parameters (total pollen limitation, limitation in pollen transfer by pollinators, reproductive assurance, and autofertility). These parameters dissociate total pollen received (potentially including pollen from allogamous, autogamous and geitonogamous pollination), pollinator-mediated pollen received (autogamy excluded), autogamous pollen received (facilitated and spontaneous self-pollination) and autofertility (spontaneous self-pollination exclusively). Additionally, we used highly informative genetic markers (microsatellites) to infer the realized mating system of *R. ferrugineum*. Such markers allow the investigation of finer facets of the mating system through multilocus methods (Ritland & Jain, 1981, Ritland, 2002).

Specifically, in this study, we asked the following questions: (i) Are visitation rates per flower positively (Allee effect) or negatively (intraspecific competition) related to *R. ferrugineum* floral display? (ii) Do floral traits (herkogamy and flower size) vary with the pollination context (*R. ferrugineum* floral display and pollinator visitation rate)? (iii) How are the limitation in pollen transfer by pollinators, pollen limitation, reproductive assurance and autofertility influenced by the pollination context and floral traits? And finally, (iv) How do the pollination context and floral traits jointly influence the realized mating system of *R. ferrugineum*?

MATERIALS AND METHODS

Study species

Rhododendron ferrugineum L. (Ericaceae) is an evergreen shrub with well branched trailing stems of 0.7-0.8 m height. This species is protandrous, self-compatible and reproduces both sexually and vegetatively through layering. Autonomous autogamy is possible (Escaravage *et al.*, 1997). It has a massive floral display (more than 3,000 flowers / m²) with numerous inflorescences of 5-22 bright red nectariferous tubular flowers with poricidal anther dehiscence (Escaravage *et al.*, 1997, Pornon *et al.*, 1997). Flowers presented stamen

dimorphism with an inner whorl of five long stamens and an outer whorl of five short stamens (Escaravage *et al.*, 2001). The flowering period of a population lasts for 20-30 days (June - July). The flowers, which last about 10 days, are initiated the year before they mature (Escaravage *et al.*, 1997). In a previous study, Escaravage & Wagner (2004) showed that the most efficient pollinators of *R. ferrugineum* are honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus spp.*) while Diptera (Muscid and Syrphid flies and Empididae), Lepidoptera and Coleoptera were secondary pollinators.

Rhododendron ferrugineum dominated and structured heathland communities that are widely and patchily distributed between 1400 and 2300 m a.s.l. in the Alps and the Pyrenees (Europe) (Ozenda, 1985). The size of patches in subalpine meadows and the within-patch *R. ferrugineum* floral display size and density are highly variable. In many areas, the spatial patterns of the patches mainly result from age-long burning and livestock grazing, decreasing the shrub coverage within patches and increasing the distance between the patches in a meadow.

Study site and patch characteristics

The study was conducted on a 3 km² area in the French Central Pyrenees (southern France), near the village of Camurac (42°46'31"N 01°55'45"E) where 28 *R. ferrugineum* patches were found. The patches were spatially distributed into visually distinct aggregations of *Rhododendron* shrubs and separated from each other by meadow (the distance between one patch and its five nearest patches was on average 200m). Altitudes ranged from 1550 m to 1750 m a.s.l. where snow cover usually lasts from late October until May.

To describe plant spatial pattern, we used an estimation of total *R. ferrugineum* floral display within patches which is the product of the mean density of inflorescences per m² assessed from a 0.25 x 0.25 m plot placed on 20 randomly chosen individuals per patch and the total area (m²) covered by *Rhododendron* within each patch. *R. ferrugineum* coverage per patch was estimated from (i) the area occupied by the focal shrub in a 400m² plot haphazardly placed at the patch core and (ii) the total surface of each patch (m²). Total patch area was obtained from geographic coordinates of patch perimeters recorded every 5 meters and analyzed in OziExplorer (GPS mapping software, version 3.95.4m, Des Newman). Within patches, the percentage of *R. ferrugineum* coverage ranged from 0.18% to 98% and patch areas ranged from 0.01 to 15.77 ha (1.73 ± 0.38 ha). Overall, *R. ferrugineum* floral display ranged from 170 to 33,567,317 rhododendron inflorescences (mean: 2,529,257). We assumed

floral display is relatively constant from year to year because of the longevity of *R. ferrugineum* individuals (at least 300 years; Escaravage *et al.*, 1998) and its slow growth (0.01 to 0.03 m / year; Pornon, 1994).

To test the impact of the *R. ferrugineum* floral display gradient (i.e. plant spatial pattern) on flower visitation rate, floral traits, pollination parameters and mating system estimates, we randomly chose four individuals in each patch. When less than four individuals were found per patch, we used all individuals (total sample size of 109 individuals).

Flower visitation rates

To test the impact of plant spatial pattern on the frequency of visits received by *R. ferrugineum* flowers, we recorded, on 105 target individuals (among the 109 target individuals), the number of flowers visited during two replicate 10-min observation periods from 4 June to 30 June 2009 (2100 minutes). A visitation rate per flower per 10 min was obtained by dividing the number of flowers visited by the total number of flowers on each individual. Total flower number for each individual was obtained by multiplying the total number of inflorescences by 10.8 ± 0.38 (mean \pm SE of flower number per inflorescence assessed on 120 randomly chosen inflorescences across the site). We obtained a mean flower visitation rate per patch by averaging visitation rates of individuals from the same heathland patch.

Floral traits

In order to assess the variability of the floral phenotypes along the plant spatial pattern gradient, we haphazardly collected two open-pollinated flowers on each target individual ($n = 109$) at / or near the peak of the 2009 flowering period, and preserved them in 70% alcohol. We measured length and width of the tubular corolla (to 0.01 mm). We measured the height of the stigma (from the base of the ovary to the top of the stigmatic surface) and the height of the 10 anthers (from filament insertion at the base of the ovary to the pore level). We then calculated a mean height for the short-level stamens of the outer whorl and a mean height for the long-level stamens of the inner whorl per flower (see Escaravage *et al.*, 2001) to detect size variation of each whorl along the plant spatial pattern gradient. To assess the physical separation of anthers from the stigma within an average flower, we subtracted the height of the stigma from the height of each anther (10 anther-stigma distances were calculated). When

an anther was below the stigma, we obtained a negative value. Since the deposition of self-pollen on the stigma can theoretically only be influenced by anthers above or in contact with the stigmatic surface; we did not consider negative values. Therefore, herkogamy - the smallest distance between the stigmatic surface and the closest pore of one of the anther - was assessed by selecting the lowest anther-stigma separation among the positive values. We obtained mean floral trait measurements per patch by averaging the values of individuals from the same patch.

Pollination parameters

In June 2009, four treatments replicated twice on each target individual ($n = 109$) were performed to assess the pollination environment in each patch: intact inflorescences left to natural pollination (F_{IN}), intact inflorescences hand outcrossed (F_{IX}), emasculated inflorescences left to natural pollination (F_{EN}) and bagged inflorescences left unmanipulated (F_{IB}). The two inflorescences per treatment were randomly selected on each individual. Outcross-pollen supplementations were carried out every other day with pollen collected from a distant individual in the same patch. Emasculation was performed by excising the anthers prior to anthesis to preclude self-pollen deposition: an emasculated flower sets seeds only if it has received conspecific pollen from a pollinator. A previous experiment characterizing the *R. ferrugineum* breeding system showed that the seed set of emasculated flowers was not significantly different from the seed set of unmanipulated flowers (Escaravage *et al.*, 1997) suggesting that emasculation is unlikely to alter pollinator attraction in *R. ferrugineum*. Moreover, we observed that insect pollinators did not discriminate between emasculated and intact inflorescences (C.E.L. Delmas, personal observation). In August 2009, fruits were harvested just before dehiscence to ensure the full development of the seeds. Two fruits per manipulated inflorescence were randomly selected, dissected under the stereomicroscope and filled seeds were counted. We quantified the mean number of ovules per ovary per individual by collecting two inflorescence buds per individual before blooming and preserved them in 70% alcohol. Two flowers from each inflorescence bud were dissected under a stereomicroscope and the ovules were counted. We then calculated the mean seed set per treatment per target individual by dividing the mean number of mature seeds by the mean number of ovules (F_{IX} , F_{IN} , F_{IC} and F_{EN} for each of the four treatments).

To assess pollinator-mediated seed set (excluding autogamy), we calculated a pollen transfer limitation index (PTL) based on the index used by Kalisz *et al.* (2004) to assess pollinator services for species capable of selfing: $PTL = 1 - F_{EN} / F_{IX}$.

To assess whether naturally pollinated flowers (receiving pollen from pollinators and from spontaneous autogamy) were limited by total pollen receipt, we calculated a pollen limitation index (PL; Larson & Barrett, 2000) as: $PL = 1 - F_{IN} / F_{IX}$. This index estimates the proportional increase in seed production via supplemental outcross pollination. Negative values, which indicate a higher seed production in intact than in pollen-supplemented flowers, were set to zero as done by Young & Young (1992) and Larson & Barrett (2000). Strong negative values are likely caused by experimental errors, such as damage to flowers during pollination, and very small negative values are likely caused by chance, when pollen limitation does not actually occur. The inclusion of negative values did not change the trends found in this study.

To dissociate between “full” autogamy (spontaneous and facilitated) and spontaneous autogamy only, two indexes were calculated. First, we calculated an index of reproductive assurance (RA; Lloyd & Schoen, 1992) as: $RA = 1 - F_{EN} / F_{IN}$ which estimates the proportion of seed production attributable to “full” autogamous self-pollination. Second, we calculated an index of autofertility (Eckert *et al.*, 2010) as: $AF = F_{IB} / F_{IX}$ which assesses the fraction of maximum seed production potentially achieved via autonomous autogamy. Mean (\pm SE) parameters per patch were obtained by averaging the value of each parameter of individuals from the same patch.

DNA extraction and microsatellite genotyping

In July 2009, we collected young leaves from the target 109 maternal individuals. Leaf material was conserved in silica gel until DNA extraction. In August 2009, we collected mature fruits from the target maternal individuals for progeny array analyses. We randomly chose several unmanipulated fruits on each individual to obtain open-pollinated seeds (all seeds were pooled). Three maternal individuals were not sampled since their fruits had already cracked open at the time of seed collection. The size of *R. ferrugineum* seeds is 1 to 2 mm and we germinated an unknown number of seeds from each maternal plant on moistened filter paper in the glasshouse. The greenhouse conditions allow inbreeding depression at the germination stage to be minimized (Cheptou *et al.*, 2000) and thus reduced the potential bias in outcrossing rate estimates. Ideally, 10 seedlings per family were randomly collected and

frozen until DNA extraction (mean of 9.6 seedlings per family). Germination rate was high (close to 100% on average) but was not monitored exactly as that was not the purpose of this study. Total sample size was 106 families including 1001 progeny for mating system analysis.

DNA was extracted from leaf and seedlings with the DNeasy Plant Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), following the manufacturer's protocol. Genotypes of each DNA sample were scored using 12 polymorphic microsatellite loci. Nine of the 12 were developed through pyrosequencing technology by Delmas *et al.* (2011): RF6P2, RF14P3, RF38P1, RF41P1, RF46P2, RF47P1, RF56P1, RF74P1 and RF81P1. Two were developed in *Rhododendron metternichii* by Naito *et al.* (1998): RM3D2 and RM2D2, and one in *Rhododendron simsii* by Dendauw *et al.* (2001): AZA-003. Cross-species amplification showed successful amplification and polymorphism for these three loci on a subset of our DNA samples (data not shown). We amplified the 12 loci in three different PCR sets using forward primers labeled with fluorescence. PCR amplifications of seedling and maternal plant samples were prepared by using a Tecan EVO200 liquid handling station (Tecan France, Lyon, France) and performed in a 12 μ L mix containing 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 2.5pmol of each primer, 4 μ L of DNA for seedlings (around 1 ng / μ L) or 3 μ L of DNA for adults (around 50 ng / μ L), and RNase-free water. The higher volume of DNA used for seedling samples ensured higher reproducibility in spite of low DNA concentration in those samples. Reproducibility was confirmed by performing three independent trials on height DNA samples from seedlings and maternal plants. Reactions were run for 40 cycles with hybridization temperatures of 55°C for the 9 RF-loci (allocated to 2 PCR sets; see Delmas *et al.*, 2011) and 57°C for the RMD and AZA loci (amplified in the same PCR set). Finally, all these loci were unambiguously sized using an ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with the 1200 LIZ and 400HD ROX GeneScan size standard (for RF-loci and RMD/AZA-loci, respectively) and GENEMAPPER version 4.0 software. Genotype errors due to stutter bands, allele dropout and null alleles were estimated using the Micro-Checker software (Oosterhout *et al.*, 2004).

Progeny array analysis

We used the multilocus mating system program (MLTR; Ritland, 2002) to analyze genetic data (genotypes of progenies and maternal parents). The program calculates maximum likelihood estimates of single-locus and multilocus outcrossing rates (t_s and t_m , respectively) as well as correlated mating parameters such as the correlation of selfing (r_s) and the

correlation of outcrossed paternity (r_p) within progeny arrays which is the proportion of full-sibs among outcrossed sibs (Ritland, 1989). A lack of correlation of selfing indicates that the selfing rate does not vary among families within a patch. An estimation of the number of different paternal parents within progeny can be assessed by $1 / r_p$ (Sun & Ritland, 1998). Biparental inbreeding (inbreeding as a result of crossing with related individuals; Ritland, 1986) was assessed by the difference ($t_m - t_s$). The low number of adults sampled per patch did not allow an accurate estimation of F (inbreeding coefficients) and we will not comment on this estimation. A Newton-Raphson algorithm was used to fit the observed proportions of genotypes descended from a known maternal genotype to the proportions expected under the mixed-mating model (Ritland & Jain, 1981, Ritland, 1989). Standard errors for each estimate were calculated as the SD of 1000 replicate bootstrap estimates, with the progeny array as the unit of resampling. The program can estimate allelic frequencies in the pollen pool and in the ovule pool separately. As pollen and ovule allele frequencies did not differ significantly, we constrained the equality of frequencies to increase the statistical power of other estimates (Ritland, 2002). The analyses were performed with the patch identity as a group factor and mating system estimates (t_s , t_m , r_s , and r_p) are obtained for each patch ($n = 28$).

Statistical analyses

We checked for spatial autocorrelation in the dataset using Moran's I parametric test implemented in the PROC VARIOGRAM (SAS Software package version 9.1, SAS Institute 2003). Spatial autocorrelation was detected in *R. ferrugineum* visitation rate only (Moran's Index = -0.0367, $Z = 7.83$, $P < 0.0001$).

To test the effect of *R. ferrugineum* floral display on the response variables (pollination parameters, floral traits and mating system estimates), we performed linear and polynomial (when appropriate) regressions (PROC REG and PROC NLIN). We performed a mixed model with an exponential covariate structure to test the relationship between *R. ferrugineum* floral display and visitation rate and took spatial autocorrelation into account (PROC MIXED of SAS Software; Cressie 1993). An exponential covariance structure fitted our data better than Gaussian or spherical models.

The response and independent variables were log-transformed when necessary to achieve normality after a test of model residuals for adherence to a normal distribution and homogeneity of variances.

RESULTS

Visitation rate

Overall, hymenopterans (mainly *Bombus spp.*) performed 80% of the visits (16% of visits were performed by dipterans and 4% by lepidopterans). Mean flower visitation rate per 10 min (all visitors pooled) decreased significantly with increasing *R. ferrugineum* floral display ($F = 8.79$, $P = 0.0066$; Fig. 1A).

Floral traits

Mean (SE) corolla length and width were on average 10.43 ± 0.1 mm and 5.60 ± 0.1 mm, respectively. The mean height of stigmas was 7.94 ± 0.1 mm and the mean height of the five long and five short stamens were 9.34 ± 0.1 mm and 7.40 ± 0.08 mm, respectively. A mean of 6 / 10 anthers per flower were above the stigma (ranging from 0 to 10). Herkogamy reached in average 0.33 ± 0.02 mm.

Table 1. Pearson correlation matrix of floral traits (n = 28 patches).

	Cor. length	Cor. width	Stig. height	LS height	SS height
Cor. width	0.31 0.10	-			
Stig. height	0.62 0.0004	0.26 0.19	-		
LS height	0.65 0.0002	0.31 0.11	0.70 <0.0001	-	
SS height	0.54 0.0030	0.40 0.034	0.67 <0.0001	0.91 <0.0001	-
Herkogamy	-0.14 0.48	-0.21 0.29	-0.40 0.037	-0.06 0.76	-0.08 0.7

Values are Pearson correlation coefficient and P value below. Cor. Indicates corolla; Stig., stigma; LS, long stamens; SS, short stamens.

A correlation matrix of floral traits is presented in Table 1. We found that the height of both stamens and stigma increased significantly with the length of the corolla. Moreover, herkogamy decreased with increasing stigma height. There was no evidence of a significant relationship between *R. ferrugineum* floral display and flower size or herkogamy while stamens and stigma height within flowers increased significantly with floral display (Table 2).

Table 2. Results of regression analyses between *R. ferrugineum* floral display gradient and floral traits, pollination parameters and the realized mating system.

	<i>R. ferrugineum</i> floral display	
	R ²	P
Cor. width	0.06	0.19
Cor. length	0.04	0.33
Stig. height	0.19 (+)	0.02
LS height	0.19 (+)	0.02
SS height	0.21 (+)	0.015
Herkogamy	0.02	0.44
<i>PTL</i>	0.074	0.18
<i>PL</i>	0.16 (+)	0.036
<i>RA</i>	0.36 (*)	0.005
<i>AF</i>	0	0.98
t_m	0.14 (+)	0.037
r_p	0.02	0.5
$1/r_p$	0.02	0.82
BI	0.04	0.33

Abbreviations: Cor. = corolla; Stig. = stigma; LS = long stamens; SS = short stamens; *PTL* = Pollen Transfer Limitation; *PL* = Pollen Limitation; *RA* = Reproductive assurance; *AF* = Autofertility; t_m = multilocus outcrossing rates, r_p = correlation of paternity; $1/r_p$ = paternal parents within progeny; *BI* = biparental inbreeding; Bold values: Significant variables ($p < 0.05$). Trends are shown in parentheses. * Non-linear regressions (see text for details).

Pollination parameters

Mean seed set for each treatment and their comparison are presented in Table 3. Overall, the mean seed set from intact flowers (F_{IN}) was not significantly different from the mean seed set from cross-pollen supplemented flowers (F_{IX}). The mean seed set from emasculated flowers (F_{EN}) was significantly lower than F_{IX} and F_{IN} . Autonomous self-pollination resulted in the production of seeds as indicated by the mean seed set from bagged flowers (F_{IB}) but it was the smallest seed set of the four treatments. As expected under pollinator limitation and unlike conditions necessary for the Allee effect to occur, the mean seed set from unmanipulated flowers (F_{IN}) decreased significantly with increasing *R. ferrugineum* floral display ($R^2 = 0.26$, $P = 0.006$).

Pollen transfer limitation (*PTL*) reached 0.34 on average (34% reduction in seed set due to failure in conspecific pollen transfer), ranging from 0.12 to 0.78. *PTL* was not significantly affected by *R. ferrugineum* floral display (Table 2, Fig. 1B). Total pollen limitation (*PL*) was low in average (0.12; maximum *PL* = 0.35) confirming the non-significant differences between the overall seed set of F_{IX} and F_{IN} treatments. However, *PL* increased significantly

with increasing *R. ferrugineum* floral display (Table 2, Fig. 1C). Reproductive assurance (RA) increased seed production by 24% on average (mean RA = 0.24) and ranged from -0.08 to 0.53. We found a significant quadratic relationship between RA and *R. ferrugineum* floral display ($y = -0.036x^2 + 0.3107x - 0.3421$; Table 2; Fig. 1D) with the lowest RA recorded in large dense patches. Autofertility (AF) reached on average 0.60 (0.03 to 1.48) was similar along the *R. ferrugineum* floral display gradient (Table 2, Fig. 1E) suggesting that the ability to spontaneously self-pollinate did not vary along the gradient. We additionally tested the relationship between herkogamy and AF as we hypothesized they could be linked. However, AF was not related to herkogamy ($R^2 = 0.03$; $P = 0.36$).

Table 3. Mean (\pm SE) seed set from the four pollination treatments. F_{IN} = intact flowers left to natural pollination; F_{IX} = intact flowers hand outcrossed; F_{IB} = bagged flowers left unmanipulated; F_{EN} = emasculated flowers left to natural pollination. Treatments with the same letter do not differ significantly (paired t-test, $P > 0.05$).

Pollination treatment	Mean seed set (\pm SE)	Paired t-test
F_{IN}	0.70 (0.028)	a
F_{IX}	0.73 (0.034)	a
F_{EN}	0.51 (0.037)	b
F_{IB}	0.42 (0.032)	c

Mating system estimates

Overall, all loci were polymorphic and the number of alleles per locus varied from 2 to 18. The analysis of raw data in the Micro-Checker software (Oosterhout *et al.*, 2004) showed that the results were not due to genotyping errors or null alleles (not shown). Overall, *R. ferrugineum* have a mixed mating system with a mean t_m reaching 0.51 and ranging from 0.163 ± 0.069 to 0.791 ± 0.294 per patch. Complete selfing or complete outcrossing was not recorded. Average biparental inbreeding ($t_m - t_s$) was significantly higher than zero (0.12 ± 0.029 ; t-test, $P = 0.0002$) meaning that outcross mating occurs between relatives within patches. The overall proportion of siblings with a common father (r_p) was 0.71 (range 0.16 to 1) and 1 to 6 different paternal parents were found within progeny. The correlation of selfing (r_s) was low on average (0.17), ranging from -0.08 to 0.631. Only five patches had a value of r_s significantly different from zero (higher than twice the standard error). This indicates that the selfing rate varies significantly among families within these 5 patches only.

We found a significant positive relationship between t_m and *R. ferrugineum* floral display (Table 2; Fig. 1F). Additionally, t_m decreased significantly with autofertility ($R^2 = 0.15$, $P = 0.04$). The correlation of paternity and the number of paternal parents (r_p , $1/r_p$) as well as biparental inbreeding did not vary significantly along the floral display gradient (Table 2).

DISCUSSION

In this paper, we show how ecological factors in spatially heterogeneous landscapes affect the realized mating system in the mass flowering species *R. ferrugineum*. Flower visitation rate was higher in small sparse patches as well as the production of seeds and selfing rate. Integrating the analysis of pollinator activity, floral traits and pollination features along a floral display gradient allowed us to highlight that the variation in the realized mating system of the focal mass-flowering species was not driven by changes in the ability to autonomously self-fertilize but by context-dependent pollination.

Pollination in a mass-flowering species

Here, we demonstrated an increase in total pollen limitation (PL) with *R. ferrugineum* floral display resulting in a lower seed set in large dense than in small sparse patches. This result was unexpected since in fragmented habitat, pollination has been shown to be positively related to plant availability, providing the conditions necessary to the Allee effect to occur (Groom, 1998, Cheptou & Avendano, 2006). In contrast, pollination in our mass-flowering species is probably mainly driven by high intraspecific competition for pollinator services. Indeed, flower visitation rate was negatively related to *R. ferrugineum* floral display size, likely resulting from pollinator dilution among the abundance of flowers in the largest patches. However, despite this change in the pattern of visits, pollen transfer limitation (PTL), which assessed pollinator-mediated seed set (self-pollination excluded), was shown to be independent of *R. ferrugineum* floral display. The reason could be that the increase in visitation rate is counterbalanced by the decrease in conspecific plant availability resulting in similar pollen transfer in large dense and small sparse patches. In addition to similar pollen transfer, we found that the ability for spontaneous autogamy (autofertility, AF) and herkogamy were not related to the floral display gradient.

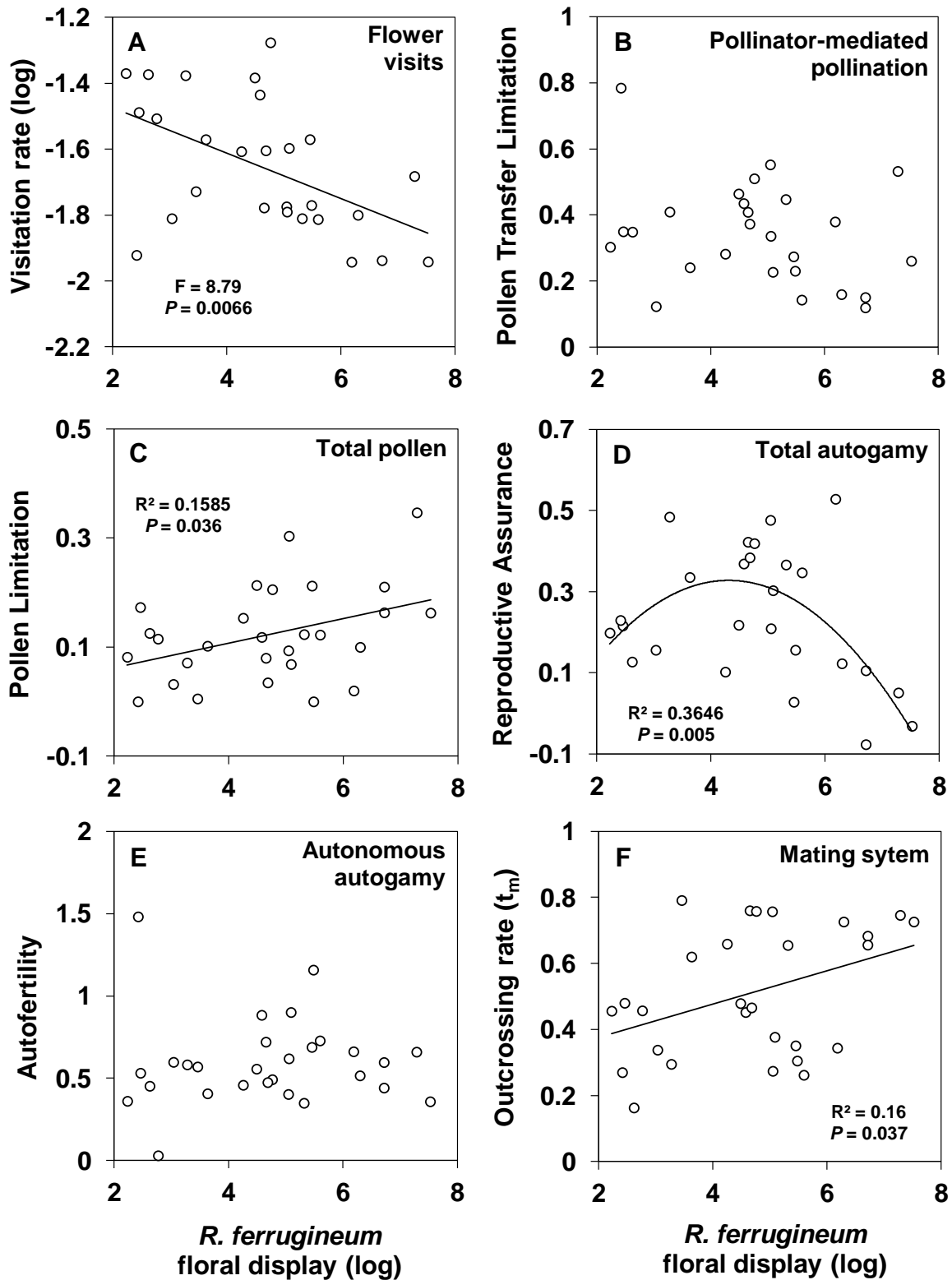


Figure 1. *Rhododendron ferrugineum* floral display as related to (A) visitation rate; (B) pollen transfer limitation; (C) pollen limitation; (D) reproductive assurance; (E) autofertility; (F) multilocus outcrossing rates (t_m). Note: scale is different on y-axes. See text for pollination index calculation details. The lines correspond to significant relationships (see Table 2).

As a consequence, since pollen transfer (including allogamy and geitonogamy) as well as spontaneous autogamy were not influenced by *R. ferrugineum* floral display, the variation in total PL could be only due to changes in pollinator mediated self-pollination resulting from the varying flower visitation rate observed along the *R. ferrugineum* floral display gradient. *R. ferrugineum* is mainly pollinated by *Bombus soroensis* (Delmas *et al.* unpublished data) which exhibits buzz-pollinate behavior. Buzz pollination likely enhances intrafloral self-pollen deposition of species with a poricidal anther such as *R. ferrugineum* (Buchmann, 1983, Larson & Barrett, 1999). The contribution of facilitated autogamy to seed set is included in the RA index and has previously been shown to contribute to seed production (Lloyd, 1992, Vaughton & Ramsey, 2010). Accordingly, we found a reduced RA that did not alleviate PL in large dense patches where flower visitation rate was low. However, the level of RA peaked at intermediate *R. ferrugineum* floral display and decreased in the smallest patches (quadratic relationship). This trend could be due, for instance, to high visitation rate from insects that did not induce facilitated autogamy (e.g. dipterans) in small sparse patches. Overall, our results showed the role of RA in mitigating but not completely alleviating PL in small sparse *R. ferrugineum* patches. The role of RA in mitigating PL has been the focus of recent studies but there is still need for empirical evidence (Kennedy & Elle, 2008, Friedman & Barrett, 2009, Weber & Goodwillie, 2009, Gonzalez & Perez, 2010, Marten-Rodriguez & Fenster, 2010).

Variation in the realized mating system: floral traits or pollination context effect?

We evidenced a mixed mating strategy in *R. ferrugineum* ($0.2 < t_m < 0.8$). We thus demonstrated that the mating system is not only mixed (*sensu* Goodwillie *et al.*, 2005) but also highly variable even at a small spatial scale. In hermaphroditic self-compatible plants, outcrossing rates depend on factors affecting the relative amount of self versus outcross pollen received by stigmas and post pollination processes (Holsinger, 1991, Lloyd & Schoen, 1992, Kalisz *et al.*, 2004).

We found that the outcrossing rate (t_m) increased with increasing *R. ferrugineum* floral display and was about 30% higher in large dense than in small sparse patches. Autofertility, herkogamy as well as flower size did not vary along the plant spatial pattern gradient suggesting that the mating system variation is not due to an evolutionary shift in the mating system. Context-dependent pollination is more likely to be responsible for the increased selfing rate in small sparse patches. The effect of the pollination context on the realized

mating system has been shown in some species (Routley *et al.*, 1999, Franceschinelli & Bawa, 2000) while significant relationships between floral traits and mating pattern have been demonstrated in others (Elle & Hare, 2002, Takebayashi *et al.*, 2006, Herlihy & Eckert, 2007). The higher selfing rate recorded in small sparse patches supports our hypothesis of the contribution of pollinator-mediated self-pollination to seed set. Enhanced selfing rates may also be a by-product of higher geitonogamy in small sparse patches resulting in a higher proportion of self pollen deposited on stigmas. Indeed, the number of flowers visited within the same individual by one insect may increase at low plant density and small display size (Harder and Barrett 1996; Snow *et al.* 1996), resulting in an increase of geitonogamous pollination. Importantly, the increase in seed set via selfing in small sparse patches suggests that both mediated self-pollination and geitonogamy may contribute to RA in small and sparse plant populations when the availability of pollinators is not the limiting factor for reproduction (Lloyd, 1992, Goodwillie *et al.*, 2005). Studies on the potential costs of selfing such as inbreeding depression (Knight, 1799, Charlesworth & Charlesworth, 1987), pollen and seed discounting (Lloyd, 1979, Holsinger, 1996, Herlihy & Eckert, 2002) should be performed to understand the evolutionary outcome of selfing in small sparse patches.

In large dense patches, we would have expected the observed total PL to favor the selection on traits increasing spontaneous self-pollination as a means of RA (Kalisz & Vogler, 2003, Moeller & Geber, 2005, Morgan & Wilson, 2005, Brys & Jacquemyn, 2011). However, the separation between the closest anther above the stigma (mean herkogamy of 0.33 mm) allowed moderate autonomous self-pollination (mean seed production of 40% for bagged flowers). Surprisingly, herkogamy was not related to AF. Since the length of the style increases during floral life span in *R. ferrugineum* (Delmas C.E.L., personal observation), it is possible that the herkogamy measured did not correspond exactly to the herkogamy experienced by flowers at the time of autonomous selfing. In addition, although AF was similar along the plant spatial pattern gradient, it was negatively related to t_m . The highest t_m was related to the lowest spontaneous autogamy ability suggesting the joint effect of the pollination context and AF on the realized mating system.

In this mass-flowering species, PL recorded in large dense patches was moderate and could result in the maintenance of predominant outcrossing despite reduced seed set. Under pollinator limitation, selection for increased attractive structures and floral life span may result in the maintenance of outcrossing because these traits improve individual plant success in intraspecific competition for pollinator services (Eckert *et al.*, 2010). In addition, a theoretical study showed that mixed mating systems with low to moderate selfing rates are

more likely attributable to unavoidable geitonogamous selfing (Porcher & Lande, 2005). In the same vein, under mate limitation, both facilitated selfing and geitonogamy could imply the maintenance of traits favoring pollinator attraction since they intrinsically depend on pollinator behavior. This hypothesis could explain the similar flower phenotypes (floral traits and autofertility) recorded in large dense and small sparse patches.

We showed that biparental inbreeding and the correlation of paternity were not affected by *R. ferrugineum* floral display despite the probable broad variation in mate availability expected along the plant spatial pattern gradient. The correlation of paternity indicated a small number of father siring seeds (mean of 1.8) in small sparse as well as in large dense patches and biparental inbreeding indicated that mating events occurred partly between relatives. Pollinator foraging behavior and small seed dispersion may be responsible for mating among near neighboring individuals likely resulting in population substructure (Levin 1988; Heywood 1991).

Conclusions

This study highlights the need to integrate pollination and floral biology approaches with marker-based estimation of plant mating systems in order to disentangle the causes of mating pattern variation. We found that the realized mating system of the focal mass-flowering species was jointly influenced by the pollination context and autofertility. More specifically, mate *versus* pollinator reduced availability resulted in diverse pollination context and mating patterns. We did observe the expected higher frequencies of self-fertilization under mate limitation (Eckert *et al.*, 2010) but here, it was likely due to higher facilitated selfing and low cross-pollen transfer and not to an increase in the ability to autonomously self-pollinate. Pollinator limitation in large dense patches (intraspecific competition for pollinator services) resulted in the maintenance of a high outcrossing rate despite reduced seed production. Finally, our study evidenced the contribution of facilitated autogamy to RA under mate limitation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank P. Buscail, M. Ferval, and L. Verneuil for help with data collection and C. Le Corre for help with DNA extraction. This work was supported by La Fondation Pour la Recherche sur la Biodiversité (COMBIO project N° AAP-IN-2009-013) and a French Ministry grant to CELD. This work is part of the "Laboratoire d'Excellence (LABEX)" entitled TULIP (ANR -10-LABX-41).

REFERENCES

- Aizen, M. A. & Feinsinger, P. (1994) Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco dry forest, Argentina. *Ecology*, **75**, 330-351.
- Aizen, M. A. & Feinsinger, P. (2003) Bees not to be? Responses of insect pollinator faunas and flower pollination to habitat fragmentation. *How landscapes change* (eds G. A. Bradshaw & P. A. Marquet), pp. 111-129. Springer-Verlag Berlin, Germany.
- Aizen, M. A. & Harder, L. D. (2007) Expanding the limits of the pollen-limitation concept: Effects of pollen quantity and quality. *Ecology*, **88**, 271-281.
- Baker, H. G. (1955) Self-compatibility and establishment after 'long distance' dispersal. *Evolution*, **9**.
- Baker, H. G. (1967) Support for Baker's law as a rule. *Evolution*, **21**, 853-856.
- Barrett, S. C. H. & Case, A. L. (2006) The ecology and evolution of gender strategies in plants: the example of Australian *Wurmbea* (Colchicaceae). *Australian Journal of Botany*, **54**, 417-433.
- Brys, R. & Jacquemyn, H. (2011) Variation in the functioning of autonomous self-pollination, pollinator services and floral traits in three *Centaureum* species. *Annals of Botany*, **107**, 917-925.
- Brys, R., Jacquemyn, H., Endels, P., van Rossum, F., Hermy, M., Triest, L., De Bruyn, L. & Blust, G. D. E. (2004) Reduced reproductive success in small populations of the self-incompatible *Primula vulgaris*. *Journal of Ecology*, **92**, 5-14.
- Buchmann, S. L. (1983) Buzz pollination in angiosperms. *Handbook of experimental pollination biology* (eds C. E. Jones & J. R. Little), pp. 73-113. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 237-268.
- Cheptou, P. O. (2011) Clarifying Baker's law. *Annals of Botany*.
- Cheptou, P. O. & Avendano, L. G. (2006) Pollination processes and the Allee effect in highly fragmented populations: consequences for the mating system in urban environments. *New Phytologist*, **172**, 774-783.
- Cheptou, P. O., Imbert, E., Lepart, J. & Escarre, J. (2000) Effects of competition on lifetime estimates of inbreeding depression in the outcrossing plant *Crepis sancta* (Asteraceae). *Journal of Evolutionary Biology*, **13**, 522-531.
- Cressie, N. (1993), *Statistics for Spatial Data*, Revised Edition, New York: John Wiley & Sons.
- Darwin, C. (1876) *The effects of cross and self fertilization in the vegetable kingdom*. John Murray, London, UK.
- Dauber, J., Biesmeijer, J. C., Gabriel, D., Kunin, W. E., Lamborn, E., Meyer, B., Nielsen, A., Potts, S. G., Roberts, S. P. M., Sober, V., Settele, J., Steffan-Dewenter, I., Stout, J. C., Teder, T., Tscheulin, T., Vivarelli, D. & Petanidou, T. (2010) Effects of patch size and density on flower visitation and seed set of wild plants: a pan-European approach. *Journal of Ecology*, **98**, 188-196.
- Delmas, C. E. L., Lhuiller, E., Pornon, A. & Escaravage, N. (2011) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) using pyrosequencing technology. *American Journal of Botany*, **98**, e120-e122.
- Dendauw, J., De Riek, J., Arens, P., Van Bockstaele, E., Vosman, B. & De Loose, M. (2001) Development of sequenced tagged microsatellite site (STMS) markers in Azalea. *Proceedings of the International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture* pp. 193-197.
- Duncan, D. H., Nicotra, A. B., Wood, J. T. & Cunningham, S. A. (2004) Plant isolation reduces outcross pollen receipt in a partially self-compatible herb. *Journal of Ecology*, **92**, 977-985.
- Eckert, C. G. (2000) Contributions of autogamy and geitonogamy to self-fertilization in a mass-flowering, clonal plant. *Ecology*, **81**, 532-542.
- Eckert, C. G., Kalisz, S., Geber, M. A., Sargent, R., Elle, E., Cheptou, P. O., Goodwillie, C., Johnston, M. O., Kelly, J. K., Moeller, D. A., Porcher, E., Ree, R. H., Vallejo-Marin, M. & Winn, A. A. (2010) Plant mating systems in a changing world. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**, 35-43.
- Elle, E. & Hare, J. D. (2002) Environmentally induced variation in floral traits affects the mating system in *Datura wrightii*. *Functional Ecology*, **16**, 79-88.
- Escaravage, N., Flubacker, E., Pornon, A., Doche, B. & Till-Bottraud, I. (2001) Stamen dimorphism in *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae): Development and function. *American Journal of Botany*, **88**, 68-75.
- Escaravage, N., Pornon, A., Doche, B. & Till-Bottraud, I. (1997) Breeding system in an alpine species: *Rhododendron ferrugineum* L (Ericaceae) in the French northern Alps. *Canadian journal of botany*, **75**, 736-743.
- Escaravage, N., Questiau, S., Pornon, A., Doche, B. & Taberlet, P. (1998) Clonal diversity in a *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) population inferred from AFLP markers. *Molecular Ecology*, **7**, 975-982.
- Escaravage, N. & Wagner, J. (2004) Pollination effectiveness and pollen dispersal in a *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) population. *Plant Biology*, **6**, 606-615.
- Fisher, R. A. (1941) Average excess and average effect of a gene substitution. *Annals of Eugenics*, **11**, 53-63.

- Franceschinelli, E. V. & Bawa, K. S. (2000) The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity*, **84**, 116-123.
- Friedman, J. & Barrett, S. C. H. (2009) Wind of change: new insights on the ecology and evolution of pollination and mating in wind-pollinated plants. *Annals of Botany*, **103**, 1515-1527.
- Gonzalez, A. V. & Perez, F. (2010) Pollen Limitation and Reproductive Assurance in the Flora of the Coastal Atacama Desert. *International Journal of Plant Sciences*, **171**, 607-614.
- Goodwillie, C., Kalisz, S. & Eckert, C. G. (2005) The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **36**, 47-79.
- Groom, M. J. (1998) Allee effects limit population viability of an annual plant. *American Naturalist*, **151**, 487-496.
- Harder, L. D. & Barrett, S. C. H. (1995) Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. *Nature*, **373**, 512-515.
- Herlihy, C. R. & Eckert, C. G. (2002) Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilizing plant. *Nature*, **416**, 320-323.
- Herlihy, C. R. & Eckert, C. G. (2007) Evolutionary analysis of a key floral trait in *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae): Genetic variation in herkogamy and its effect on the mating system. *Evolution*, **61**, 1661-1674.
- Holsinger, K. E. (1991) Mass-action models of plant mating systems: the evolutionary stability of mixed mating systems. *American Naturalist*, **138**, 606-622.
- Holsinger, K. E. (1996) Pollination biology and the evolution of mating systems in flowering plants. *Evolutionary Biology*, Vol 29pp. 107-149.
- Husband, B. C. & Schemske, D. W. (1996) Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, **50**, 54-70.
- Jain, S. K. (1976) The evolution of inbreeding in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **7**, 469-495.
- Kalisz, S. & Vogler, D. W. (2003) Benefits of autonomous selfing under unpredictable pollinator environments. *Ecology*, **84**, 2928-2942.
- Kalisz, S., Vogler, D. W. & Hanley, K. M. (2004) Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature*, **430**, 884-887.
- Kameyama, Y. & Kudo, G. (2009) Flowering phenology influences seed production and outcrossing rate in populations of an alpine snowbed shrub, *Phyllodoce aleutica*: effects of pollinators and self-incompatibility. *Annals of Botany*, **103**, 1385-1394.
- Karron, J. D., Mitchell, R. J., Holmquist, K. G., Bell, J. M. & Funk, B. (2004) The influence of floral display size on selfing rates in *Mimulus ringens*. *Heredity*, **92**, 242-248.
- Kennedy, B. F. & Elle, E. (2008) The reproductive assurance benefit of selfing: importance of flower size and population size. *Oecologia*, **155**, 469-477.
- Knight, T. (1799) Experiments on the fecundation of vegetables. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **89**, 195-204.
- Knight, T. M., Steets, J. A., Vamosi, J. C., Mazer, S. J., Burd, M., Campbell, D. R., Dudash, M. R., Johnston, M. O., Mitchell, R. J. & Ashman, T. L. (2005) Pollen limitation of plant reproduction: Pattern and process. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **36**, 467-497.
- Kunin, W. E. (1997) Population size and density effects in pollination: Pollinator foraging and plant reproductive success in experimental arrays of *Brassica kaber*. *Journal of Ecology*, **85**, 225-234.
- Larson, B. M. H. & Barrett, S. C. H. (1999) The ecology of pollen limitation in buzz-pollinated *Rhexia virginica* (Melastomataceae). *Journal of Ecology*, **87**, 371-381.
- Larson, B. M. H. & Barrett, S. C. H. (2000) A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, **69**, 503-520.
- Lloyd, D. G. (1979) Some reproductive factors affecting the selection of self-fertilization in plants. *American Naturalist*, **113**, 67-79.
- Lloyd, D. G. (1992) Self-and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, **153**, 370-380.
- Lloyd, D. G. & Schoen, D. J. (1992) Self-and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences*, **153**, 358-369.
- Lloyd, D. G. (1992) Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, **153**, 370-380.
- Marten-Rodriguez, S. & Fenster, C. B. (2010) Pollen limitation and reproductive assurance in Antillean Gesnerieae: a specialists vs. generalist comparison. *Ecology*, **91**, 155-165.
- Moeller, D. A. & Geber, M. A. (2005) Ecological context of the evolution of self-pollination in *Clarkia xantiana*: Population size, plant communities, and reproductive assurance. *Evolution*, **59**, 786-799.

- Morgan, M. T. & Wilson, W. G. (2005) Self-fertilization and the escape from pollen limitation in variable pollination environments. *Evolution*, **59**, 1143-1148.
- Naito, K., Isagi, Y. & Nakagoshi, N. (1998) Isolation and characterization of microsatellites of *Rhododendron metternichii* Sieb. et Zucc. var. *hondoense* Nakai. *Molecular Ecology*, **7**, 927-928.
- Oosterhout, C. V., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. & Shipley, P. (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535-538.
- Ozenda, P. (1985) *La végétation de la chaîne alpine dans l'espace montagnard européen*. Masson, Paris.
- Porcher, E. & Lande, R. (2005) The evolution of self-fertilization and inbreeding depression under pollen discounting and pollen limitation. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**, 497-508.
- Pornon, A. (1994) *Dynamique et fonctionnement des populations de Rhododendron ferrugineum L. (éricacée). (Etage subalpin; Alpes Nord-occidentales)*. Thèse de Doctorat. Université de Grenoble.
- Pornon, A., Escaravage, N., Till-Bottraud, I. & Doche, B. (1997) Variation of reproductive traits in *Rhododendron ferrugineum* L (Ericaceae) populations along a successional gradient. *Plant Ecology*, **130**, 1-11.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. & Kunin, W. E. (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**, 345-353.
- Ritland, K. (1986) Joint maximum-likelihood-estimation of genetic and mating structure using open-pollinated progenies. *Biometrics*, **42**, 25-43.
- Ritland, K. (1989) Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. *Evolution*, **43**, 848-859.
- Ritland, K. (2002) Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity*, **88**, 221-228.
- Ritland, K. & Jain, S. (1981) A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity*, **47**, 35-52.
- Routley, M. B., Mavraganis, K. & Eckert, C. G. (1999) Effect of population size on the mating system in a self-compatible, autogamous plant, *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae). *Heredity*, **82**, 518-528.
- Sun, M. & Ritland, K. (1998) Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*), a successful colonizer in North America. *Heredity*, **80**, 225-232.
- Takebayashi, N., Wolf, D. E. & Delph, L. F. (2006) Effect of variation in herkogamy on outcrossing within a population of *Gilia achilleifolia*. *Heredity*, **96**, 159-165.
- Vaughton, G. & Ramsey, M. (2010) Pollinator-mediated selfing erodes the flexibility of the best-of-both-worlds mating strategy in *Bulbine vagans*. *Functional Ecology*, **24**, 374-382.
- Weber, J. J. & Goodwillie, C. (2009) Evolution of the mating system in a partially self-incompatible species: reproductive assurance and pollen limitation in populations that differ in the timing of self-compatibility (vol 170, pg 885, 2009). *International Journal of Plant Sciences*, **170**, 1102-1102.
- Wilcock, C. & Neiland, R. (2002) Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science*, **7**, 270-277.
- Young, H. J. & Young, T. P. (1992) Alternative outcomes of natural and experimental high pollen loads. *Ecology*, **73**, 639-647.

CHAPITRE 5

The non-adaptive value of selfing in fragmented plant patches: the case of a mass-flowering shrub

The non-adaptive value of selfing in fragmented plant patches: the case of a mass-flowering shrub

Delmas C.E.L.^{1,2,3}, Cheptou P-O.⁴, Escaravage N.^{1,2}, Charrier O.^{1,2}, Ruzafa S.⁵, Pornon A.^{1,2}

¹ *Université de Toulouse, ENFA; UMR 5174 EDB (Laboratoire Évolution & Diversité Biologique); 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France*

² *CNRS, Université Paul Sabatier; UMR 5174 EDB, F-31062 Toulouse, France*

³ *For correspondence. E-mail chloedelmas@gmail.com*

⁴ *UMR 5175 CEFE – Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CNRS), 1919 Route de Mende, F-34293 Montpellier Cedex 05, France*

⁵ *Plateforme Génomique, UMR444 Laboratoire de Génétique Cellulaire, 24 Chemin de Borde Rouge, 31326 Castanet-Tolosan, France*

(En préparation)

ABSTRACT

Reduction of mate and/or pollinator availability may result in strong selective pressure on plant mating system through pollination failure. However, the evolutionary response to these selective pressures is dependent on the adaptive value of selfed *versus* outcrossed progenies. We used a broad gradient of patch floral display size to assess the effect of local fragmentation on multilocus outcrossing rate (t_m) and lifetime inbreeding depression (ID) of a mass-flowering and self-compatible shrub, *Rhododendron ferrugineum*. We additionally estimated pollinator-mediated seed set, open seed and fruit set, self-compatibility and pollen:ovule ratio. Our results indicate an increase in seed production (reproductive assurance) associated to a decreased t_m in small sparse rhododendron patches. However, high lifetime ID (mean of 0.9) strongly reduced the reproductive assurance advantage of selfing in small sparse patches. Additionally, we evidenced early ID acting on selfed seed and fruit set. We discussed the potential causes of high ID despite the mixed mating system ($0.2 < t_m < 0.8$; mean P:O = 295.8) in this perennial mass-flowering species. These results demonstrate that small and sparse populations may be endangered by the non-adaptive value of selfing counteracting the expected evolutionary rescue of reproductive assurance.

Key words. Floral display; inbreeding depression; self-compatibility; selfing; pollen:ovule ratio; reproductive assurance.

INTRODUCTION

Because plants are sessile, they require pollen vectors to ensure the transfer of male gametes between individuals. Plant and pollinator populations are increasingly affected by human disturbances (Loreau et al. 2001; Biesmeijer et al. 2006) likely resulting in strong selective pressure on mating system through pollination failure (Eckert et al. 2010). When pollinator and/or mate availability is reduced, classical ecological theories predict the evolution of selfing because it may provide reproductive assurance (Darwin 1876; Lloyd 1979). However, the evolutionary outcomes of plant mating system depend on the relative fitness of crossed *versus* selfed embryos and progeny (Husband and Schemske 1996). Selfing generally reduces progeny fitness as a result of inbreeding depression (Charlesworth and Charlesworth 1987). Therefore, strong inbreeding depression may reduce the opportunity for the selection of selfing and may compromise the survival of disturbed plant populations (Hedrick and Kalinowski 2000). Investigating plant mating system along with inbreeding depression in natural populations of contrasted spatial pattern may provide new insights on the evolutionary consequences of anthropogenic disturbances.

The evolution of plant mating system rely on both ecological factors that influence the relative amount of self *versus* outcross pollen reaching the stigma (Lloyd and Schoen 1992; Holsinger 1996) and genetic factors that affect the transmission of gametes across generations (Fisher 1941). Inbreeding depression (ID) is typically caused either by the expression of lethal deleterious recessive alleles that were formerly masked by the heterozygous state or by the loss of heterozygote advantage (Charlesworth and Charlesworth 1987; Barrett and Charlesworth 1991). This is a fundamental selective cost of selfing which determines the magnitude of other potential costs and benefits (Eckert and Herlihy 2004). More specifically, when gamete discounting is negligible (Lloyd 1992), the evolution of mating system in hermaphrodites depend on the balance between ID which favor outcrossing (Lloyd 1979; Lande and Schemske 1985) and the automatic selective advantage favoring selfing (Fisher 1941). Moreover, ID can evolve with selfing rate when deleterious recessive alleles are purged by selection despite this trend failed to be generalized among plant species (Byers and Waller 1999; Johnston et al. 2009). In consequences, the theory predicts two evolutionary stable states for mating system: complete selfing when $ID < 0.5$ or complete outcrossing when $ID > 0.5$ (Lande and Schemske 1985). However, 42% of plants exhibit a mixed mating

strategy (reproducing both through selfing and outcrossing) that remains an intriguing paradox for evolutionary biologist (Goodwillie et al. 2005). The expression of ID can depend on the environment in which selfed and outcrossed progeny are compared and is often expressed more strongly under field than greenhouse conditions (Roff 1997). Moreover, ID may covary with environmental conditions among populations and years (Cheptou et al. 2002), and such variation can influence the evolution of mating system (Porcher et al. 2009; Cheptou and Donohue 2010) and references herein). To assess the strength of ID in natural populations throughout the life cycle, a marker-based approach that compares the degree of inbreeding between mature plants and progeny arrays can be used to estimate ID in natural populations (Ritland 1990; Goodwillie et al. 2005). Indeed, such an approach integrates episodes of mortality in natural populations from zygote formation to reproductive maturity over several years and had revealed very strong inbreeding depression (Routley et al. 1999; Herlihy and Eckert 2002).

In this study, we used *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae), a mass-flowering and self-compatible species which dominates and structures heathland communities between 1400 and 2300 m a.s.l. in the Alps and the Pyrenees (Europe) (Ozenda 1985). The size of patches in subalpine meadows and the within-patch *R. ferrugineum* floral availability are highly variable. In many areas, patch spatial pattern mainly result from age-long burning and livestock grazing, decreasing the coverage of the shrub within patches and increasing the distance between patches in meadow. We studied a broad gradient *R. ferrugineum* floral display describing the local patch fragmentation. Here, our objective is to assess the realized mating system and lifetime ID of *R. ferrugineum* along a gradient of patch floral display in order to estimate the evolutionary responses of mating system to local fragmentation of plant population. We additionally assessed the importance of autogamy in enhancing the seed production along the floral display gradient and examined self-compatibility, fruit set and pollen:ovule ratio to seek for potential context-dependent variation. Indeed, an increasing capacity to self may also indirectly affect other morphological floral traits such as P/O ratios, because such plants may evolve to allocate smaller amounts of resources to traits that contribute to male function relative to female function.

MATERIALS AND METHODS

Study species and study area

Rhododendron ferrugineum L. (Ericaceae) is an evergreen shrub with well branched trailing stems of 0.7-0.8 m height. Its massive floral display reaches in average more than 800 inflorescences per individual and consists of numerous inflorescences of 5-22 bright red nectariferous tubular flowers with poricidal anther dehiscence (Escaravage et al. 1997; Pornon et al. 1997). This species is protandrous, self-compatible and reproduces both sexually and vegetatively through layering. Autonomous autogamy is possible as evidenced by bagged inflorescences naturally self-pollinated (Escaravage et al. 1997). The flowering period of a population lasts for 20-30 days. Flowers last about 10 days and are initiated the year before they mature (Escaravage et al. 1997). In a previous study, (Escaravage and Wagner 2004) showed that the most efficient pollinators of *R. ferrugineum* are honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus sp.*) while Diptera (Muscid and Syrphid flies and Empididae), Lepidoptera and Coleoptera were secondary pollinators.

Study site and R. ferrugineum patch characteristics

The study was conducted on a 3 km² area in the French Central Pyrenees (southern France), near the village of Camurac (42°46'31"N 01°55'45"E). Altitudes range from 1550 m to 1750 m a.s.l. and the snow cover usually lasts from late October until May. The *R. ferrugineum* patches of the study site (n = 28) were spatially distributed into visually distinct aggregation of *Rhododendron* shrubs and separated from another patch by meadow.

To describe the local fragmentation of floral availability per patch, we used an estimation of total *R. ferrugineum* patch floral display which integrates (i) the mean number of inflorescences per m² and (ii) the total area covered by *Rhododendron* within patches. The mean number of inflorescences per m² was obtained by counting the number of inflorescences in a 0.25 x 0.25m plot placed on 20 haphazardly chosen individuals per patch. We assessed the total area covered by *R. ferrugineum* within patches from the area occupied by the focal species in a 400m² plot haphazardly placed at the patch core and the total surface of each heathland patch (m²). Patch area was obtained from geographic coordinates of patch perimeters recorded every 5 meters and analyzed in OziExplorer (GPS mapping software, version 3.95.4m, Des Newman). Patch floral display is estimated as the product of the density of inflorescences (/m²) and patch *Rhododendron* coverage (m²). Heathland patch areas ranged from 0.01 to 15.77 ha (1.73 ± 0.38 ha). Within heathland patches, the proportion of *R.*

ferrugineum coverage ranged from 0.18% to 98% (the coverage of the surrounding community is 1 minus the coverage of *R. ferrugineum*). Overall, patch floral display ranged from 170 to 33,567,317 rhododendron inflorescences (mean: 2,529,257).

DNA extraction and microsatellite genotyping

In July 2009, we collected young leaves from the target 109 maternal individuals. To assess inbreeding coefficients at the patch scale, we additionally collected leaves sample from randomly chosen adults in each patch to increase the adult sample size to 20 wherever possible (all adults were collected in other cases). Leaf material was conserved in silica gel until DNA extraction. In August 2009, we collected mature fruits from the target maternal individuals for progeny array analyses. We randomly chose several unmanipulated fruits on each individual to obtain open-pollinated seeds (all seeds were pooled). Three maternal individuals were not sampled since fruits were already dehisced at the time of seed collection. The size of *R. ferrugineum* seeds is 1 to 2 mm and we germinated an unknown number of seeds from each maternal plant on moistened filter paper in the glasshouse. The greenhouse conditions allow inbreeding depression at the germination stage to be minimized (Cheptou et al., 2000) and thus reduced the potential bias in outcrossing rate estimates. Ideally, 10 seedlings per family were randomly collected when cotyledons were developed and frozen until DNA extraction (mean of 9.6 seedlings per family). Germination rate was high (close to 100% in average) but were not monitored as it was not the purpose of this study. Total sample size was 106 families including 1001 progeny for mating system analysis and 494 adults for inbreeding coefficient analyses.

DNA was extracted from leaf and seedlings with the DNeasy Plant Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), following manufacturer's protocol. Genotypes of each DNA sample were scored by using 12 polymorphic microsatellite loci. Nine of the 12 were developed through pyrosequencing technology by (Delmas et al. 2011): RF6P2, RF14P3, RF38P1, RF41P1, RF46P2, RF47P1, RF56P1, RF74P1 and RF81P1. Two were developed in *Rhododendron metternichii* by (Naito et al. 1998): RM3D2 and RM2D2, and one in *Rhododendron simsii* by (Dendauw et al. 2001): AZA-003. Cross-species amplification showed successful amplification and polymorphism for these three loci on a subset of our DNA samples (data not shown). We amplified the 12 loci in three different PCR sets using forward primers labeled with fluorescence. PCR amplifications of seedling and maternal plant samples were prepared by using a TECAN Freedom EVO® 200 liquid handling station

(Tecan, Lyon, France) and performed in a 12 μL mix containing 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix providing a final concentration of 3 mM MgCl_2 (QIAGEN Multiplex PCR Kit), 2.5 pmol of each primer, 4 and 3 μL of DNA for seedlings and adults respectively, and distilled water provided with QIAGEN Multiplex PCR Kit. The higher quantity of DNA used for seedling samples ensure high reproducibility in spite of low DNA concentration in seedling samples (around 1 ng/ μL and around 50 ng/ μL for adult samples). Reproducibility was confirmed by performing three independent trials on four DNA samples from seedlings and maternal plants. Reactions were run for 40 cycles on a GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, California, USA) with hybridization temperatures of 55°C for the 9 RF-loci (allocated to 2 PCR sets; see Delmas et al. 2011) and 57°C for the RMD and AZA loci (amplified in the same PCR set). PCR products were diluted on a TECAN Genesis® 150 liquid handling station.

Finally, all of these loci were unambiguously sized using an ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, California, USA) with the GeneScan™ 600 LIZ® and GeneScan™ 400HD Rox™ (for RF-loci and RMD/AZA-loci, respectively) and GENEMAPPER® version 4.0 software (Applied Biosystems, California, USA).

Progeny array analysis

Single-locus and multilocus outcrossing rates (t_s and t_m , respectively) were calculated using the MLTR program (Ritland 2002) with Newton-Raphson iteration which fit the observed proportions of genotypes descended from a known maternal genotype to the proportions expected under the mixed-mating model (Ritland and Jain 1981; Ritland 1989). Standard errors for each estimate were calculated as the SD of 1,000 replicate bootstrap estimates, with the progeny array as the unit of resampling. MLTR also estimates the correlation of outcrossed paternity (r_p) which is the proportion of full-sibs among outcrossed sibs (Ritland 1989), and $1 / r_p$ gives an estimation of the number of different paternal parents within progeny (Sun and Ritland 1998). Biparental inbreeding was assessed by the difference ($t_m - t_s$). The program can estimate allelic frequencies in the pollen pool and in the ovule pool separately. As pollen and ovule allele frequencies did not differ significantly, we constrained the equality of frequencies to increase the statistical power of other estimates (Ritland 2002). The analyses are performed with the patch identity as a group factor and the estimates t_s , t_m and r_p were obtained for each patch ($n = 28$).

Inbreeding depression

We assessed lifetime ID in natural populations from seed to reproductive maturity by comparing the inbreeding coefficients (F) of mature plants to the expected F of progeny based on selfing rate ($s = 1 - t_m$) (Ritland 1990; Goodwillie et al. 2005). The difference between seedling and adult inbreeding proportion gives us the strength of ID counteracting selfing evolution. Inbreeding coefficients (F) of mature plants per patch were computed using GENETIX v4.05.2 (Belkhir et al. 1996-2004) and significance of F values were tested by applying 10,000 randomizations. In the absence of ID, the expected equilibrium value of F for mature plants is $F_e = s / (2 - s)$. As described in (Goodwillie et al. 2005), ID reduces F to $F = s \omega_s / (2 - 2s + s \omega_s)$, where w is the fitness of selfed offspring compared to outcrossed offspring (i.e., $\omega_s = 1 - \text{ID}$). ID can, therefore, be estimated as:

$$\text{ID} = 1 - 2 \left[\frac{(1 - s)F}{s(1 - F)} \right]$$

This estimator of ID assumes that populations are at inbreeding equilibrium, selfing is the only form of inbreeding, and the marker polymorphisms are neutral and not physically linked to polymorphic loci affecting fitness.

When the fitness of selfed offspring is higher than the fitness of outcrossed offspring ($\omega_s > \omega_o$, ω_o is the fitness of outcrossed offspring and ω_s the fitness of selfed offspring), (Agren and Schemske 1993) advice to use the following ID estimate: $\text{ID} = (\omega_o - \omega_s) / \omega_s$ instead of the usual $\text{ID} = (\omega_o - \omega_s) / \omega_o$ (when $\omega_s > \omega_o$). Considering the fitness of outcrossed progeny to be 1: $\text{ID} = (1/\omega_s) - 1$. The estimate of ID used in such cases is therefore:

$$\text{ID} = \left[\frac{s(1 - F)}{2F(1 - s)} \right] - 1$$

We additionally used RMES (David et al. 2007) to assess selfing rates of mature plants from the distributions of multilocus heterozygosity in patch samples. Inbreeding coefficient in parental plants (heterozygote deficiencies) may include selfing via biparental inbreeding and may be biased by technical artifacts such as null alleles, mis-scoring or partial dominance both increasing heterozygote deficiencies without real selfing (David et al. 2007; Jarne and David 2008). The RMES method is based on maximum likelihood, which has been shown to

be insensitive to mis-scoring and does not depend on F . We obtained the value of the selfing rate s for each patch (where $n > 5$ to avoid biases; 5 patches were excluded), after 1,000 iterations, and a p-value for the null hypothesis $s = 0$, obtained by resampling genotypes (random reassortment of single-locus heterozygosities among individuals within the population). We compared mature plant selfing rate, s from $F = s / (2 - s)$ with the s estimate from RMES with a paired t-test.

Pollen : Ovule ratio

To assess mean P:O ratio in each patch, we randomly chose 4 individuals in each patch (all individuals were used in patches where less than 4 individuals were found; total sample size of 109 individuals). We quantified the mean number of ovules per ovary and the mean number of pollen grains per flower by collecting 2 inflorescence buds per target individual before blooming and preserved them in 70% alcohol. Two flowers from each inflorescence bud were dissected under a stereomicroscope and the ovules were counted (total number of flowers per target individual is 4). To quantify the number of pollen tetrads, two anthers per flower were placed in 50 μ L of concentrated sulphuric acid for 48h. We added 150 μ L of water and homogenized this mix for one minute in an ultrasonic bath, which separates the tetrads from one another. Two 1- μ L subsamples were taken from each sample and placed on glass slides to count the total number of tetrads per subsample under a stereomicroscope. We estimated the total pollen production per flower (multiplying by four each tetrad) to calculate the P:O ratio for each flower and the mean P/O per target individual. Mean (\pm SE) P:O per patch was obtained by averaging the value of individuals from the same patch.

Pollination experiment

To estimate open seed set, pollinator-mediated seed set and self-compatibility along the patch floral display gradient, we performed in June 2009 four pollination treatments replicated twice on each target individual ($n = 109$): intact inflorescences (F_{IN}), bagged inflorescences hand self-pollinated (F_{IS}), emasculated inflorescences (F_{EN}) and supplementation of outcross pollen (F_{IX}). The height inflorescences were chosen haphazardly on each individual (mean number of inflorescences per individual is 796). The F_{IS} treatment was performed by bagging and letting unmanipulated two randomly selected inflorescences until the time of blooming. When the flowers bloomed, we manually self-pollinated the flowers by gently moving the anthers against the stigma. The F_{EN} treatment was performed by excising the anthers of the flowers

prior to anthesis to preclude self-pollen deposition and left open to insect visits. An emasculated flower sets seeds only if it has received conspecific pollen from a pollinator. A previous experiment characterizing *R. ferrugineum* breeding system showed that the seed set of emasculated flowers was not significantly different from the seed set of unmanipulated flowers (Escaravage et al. 1997) suggesting that emasculations are unlikely to alter pollinator attraction in *R. ferrugineum*. Outcross-pollen supplementations (F_{IX}) were carried out every other day on flowers from two randomly selected inflorescences per individual with pollen collected from a distant individual in the same patch. In August 2009, fruits were harvested just before dehiscence to ensure the full development of the seeds. Two fruits per manipulated inflorescence were randomly selected, dissected under the stereomicroscope and filled seeds were counted. We calculated the mean seed set per treatment per target individual by dividing the mean number of mature seeds by the mean number of ovules of the same individual (see above). We obtained fruit set of open pollinated inflorescences by counting the number of aborted versus filled fruits from the F_{IN} inflorescences which were unmanipulated.

To assess the ability to produce seeds via self-fertilization (self-compatibility, SC), we standardized the seed set from manually self-pollinated flowers by the seed set from cross-pollen supplemented flowers from the same individual (Lloyd and Schoen 1992):

$$SC = \frac{F_{IS}}{F_{IX}}$$

Mean (\pm SE) parameters per patch were obtained by averaging the value of each parameter of individuals from the same patch.

RESULTS

Mating system estimates

Overall, all loci were polymorphic and the number of alleles per locus varies from 2 to 18. Six microsatellite loci were polymorphic in the 28 patches. The other loci were monomorphic in 1 to 14 patches. Overall, *R. ferrugineum* have a mixed mating system with a mean t_m reaching 0.51 and ranging from 0.163 ± 0.069 to 0.791 ± 0.294 per patch. Average biparental inbreeding ($t_m - t_s$) differed significantly from zero (0.12 ± 0.029 ; t-test, $P = 0.0002$) meaning that outcross mating occurs between relatives. The overall proportion of siblings that share the same father (r_p) was 0.71 (ranging from 0.16 to 1) and 1 to 6 different paternal parents within progeny were found. The correlation of selfing (r_s) was low in average (0.17) and ranged from -0.08 to 0.631. Only five patches had a value of r_s significantly different from zero (higher

than twice the standard error). This indicates that selfing rate varied significantly among families within these 5 patches only.

Outcrossing rate (t_m) increased significantly with *R. ferrugineum* patch floral display (Fig. 1A). However, we found no significant relationship between patch floral display and the correlation of paternity (r_p , $R^2 = 0.2$; $P = 0.5$), the number of paternal parents ($1/r_p$, $R^2 = 0.02$, $P = 0.82$) as well as biparental inbreeding ($R^2 = 0.04$, $P = 0.33$).

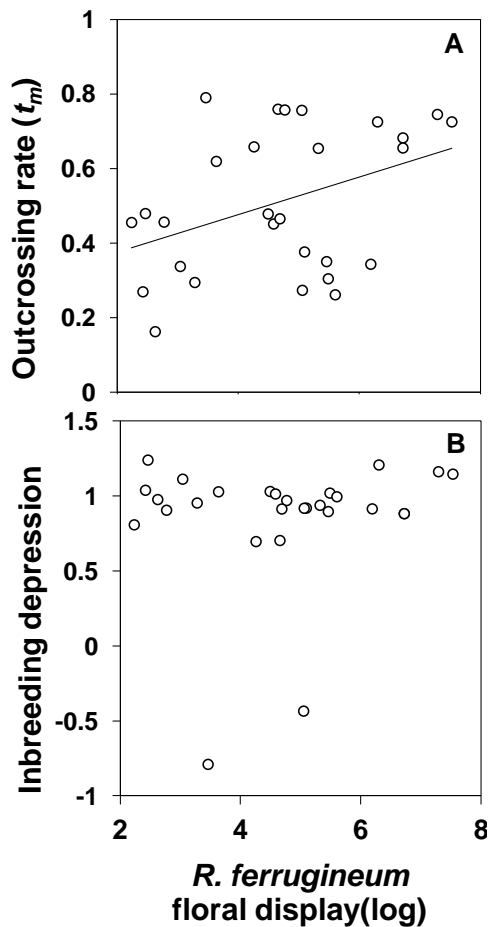


Figure 1. The effects of *R. ferrugineum* floral display within patches on (A) multilocus outcrossing rate ($R^2 = 0.16$, $P = 0.037$) and (B) inbreeding depression ($R^2 = 0.009$, $P = 0.65$).

Inbreeding depression

Estimates of ID were high, ranging from -0.78 to 1.24 (mean of 0.87) and statistically significant (t-test against $ID = 0$ or $ID = 0.5$, $P < 0.0002$). There was no evidence for a relation between the strength of ID and patch floral display ($R^2 = 0.015$, $P = 0.53$; Fig. 2C). The observed inbreeding coefficient of mature plants (F) ranged from -0.15 to 0.38 (mean of 0.03). F differed significantly from zero in 7 patches out of 28. Observed inbreeding coefficients (F) of mature plants are almost always less than expected given the level of self-fertilization (s) in natural *R. ferrugineum* patches (Fig. 2). However, in two patches,

inbreeding in maternal plants was higher than the progeny selfing rate resulting in negative inbreeding depression values (see methods for the appropriate ID estimate used).

Selfing rate estimates of mature plants using the correlations in heterozygosity among the 12 loci (RMES approach) ranged from 0 to 0.2. The overall selfing rate for all patches was 0.003. Significant selfing rates ($s > 0$; $P < 0.05$) were found in 1 patch. These estimates were not significantly different from the selfing rate assessed from the inbreeding coefficient (F) (paired t-test: $t = 0.35$; $P = 0.73$) supporting the robustness of the inbreeding depression estimation.

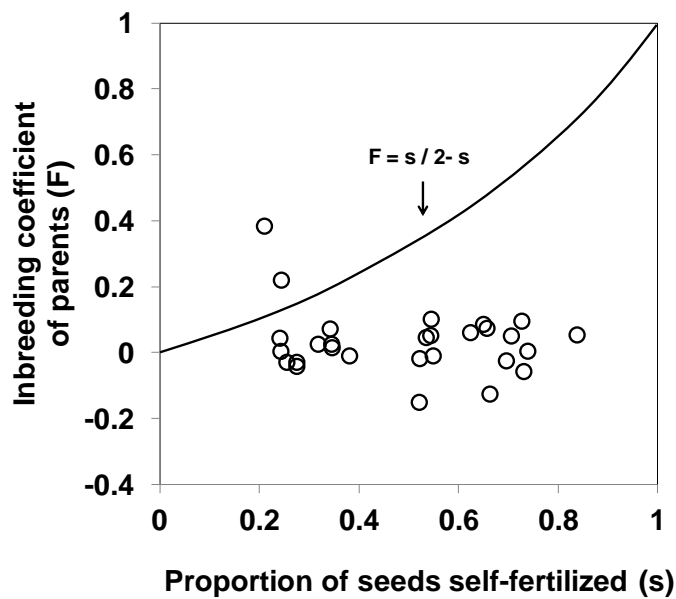


Figure 2. The relation between estimated levels of self-fertilization ($s = 1 - t_m$) and the inbreeding coefficient (F) of reproductively mature individuals in natural *R. ferrugineum* patches. The solid line shows the expected relation between s and F in patches at equilibrium (F_e) with no inbreeding depression ($ID = 1 - [\text{fitness of selfed progeny}/\text{fitness of outcrossed progeny}] = 0$).

Pollen:ovule ratio

The mean P:O ratio per patch varied from 238.4 to 368.7 and reached in average 295.8. Based on (Cruden 1977), these values indicate that *R. ferrugineum*, under our field conditions, has a facultative autogamous breeding system. We found that the level of P:O did not vary significantly with *R. ferrugineum* patch floral display ($R^2 = 0.03$, $P = 0.35$).

Reproductive success, pollinator-mediated seed set and self-compatibility

The mean fruit set per patch ranged from 80.6 to 100%, reached in average 94.5% and was positively related to *R. ferrugineum* floral display per patch (Fig. 3A). The mean seed set of intact flowers was 0.71 (from 0.44 to 1) and decreased significantly with patch floral display (Fig. 3B). Mean pollinator-mediated seed set (mean of 0.49, from 0.07 to 0.94) was significantly lower than mean open seed set (paired t-test, $P < 0.05$) and was not significantly related to patch floral display (Fig. 2A). Mean seed set from outcross pollen supplemented flowers reached in average 0.72 (0.39 to 1). The mean SC index reached in average 0.70 (0.38 to 1.09) and was not significantly affected by patch floral display ($R^2=0.02$, $P = 0.47$).

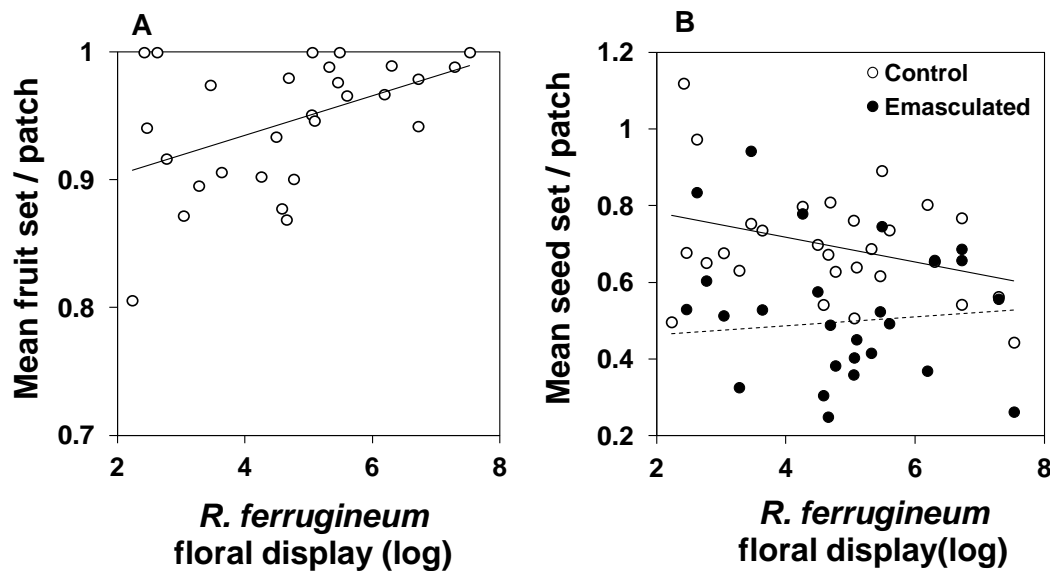


Figure 3. The effects of *R. ferrugineum* floral display within patches on (A) the mean fruit set per patch ($R^2 = 0.20$, $P = 0.018$) and (B) the mean seed set per patch for emasculated ($R^2 = 0.01$, $P = 0.61$) and control flowers ($R^2 = 0.20$, $P = 0.016$).

DISCUSSION

R. ferrugineum has a mixed mating system associated with strong inbreeding depression. The increase in local fragmentation of patches results in an increase in selfing rate associated with an increase in seed production. However, reduced fruit set in small sparse patches and inbreeding depression highly above the threshold of 0.5, suggest a non-adaptive value of

selfing in small sparse patches of this mass-flowering species that largely counterbalance the selective advantage of selfing.

Reproductive assurance and selfing rate

We find that pollinator-mediated seed set did not vary along the *R. ferrugineum* floral display gradient suggesting similar pollinator services in small sparse and large dense patches. However, open seed set was higher in small sparse comparing to large dense patches suggesting higher reproductive assurance (RA) benefit to seed production in the most locally fragmented patches. The increase in seed set may be due to higher self-compatibility or higher ability to spontaneously self-fertilize (Eckert et al. 2006). Spontaneous self-fertilization in the absence of pollinators may be mediated by reduced herkogamy or dichogamy within flowers (Moeller and Geber 2005). However, in a study performed in the same patches during the same year, we found no change of autofertility index and herkogamy along the floral display gradient (Delmas et al. unpubl.). We also evidenced that the variation in RA was mainly driven by facilitated selfing through an increase in flower visitation rates in the most locally fragmented patches. The increase in flower visitation rate in small sparse patches may be counterbalanced by the reduction in conspecific plant abundance resulting in the similar pollinator service recorded (Delmas et al. unpubl.). Moreover in the present study, we showed that self-compatibility (SC) did not vary along the gradient of local fragmentation. P:O ratio was also similar in small sparse and in large dense patches and indicated a facultative autogamous breeding system (Cruden 1977). These results confirmed that the increase in open seed production in small sparse patches is mainly driven by the pollination context and not by higher selfing ability.

Accordingly to the higher contribution of autogamy to seed set found in small sparse patches (RA), we found an increase in selfing rate ($1 - t_m$) with decreasing *R. ferrugineum* floral display. Reduced outcrossing rate with reduced population size or density has already highlighted and has sometimes been explain by the ecological context (Karron et al. 1995; Franceschinelli and Bawa 2000) or by the evolution of floral traits related to the ability to self-fertilize (Moeller and Geber 2005). As discussed above, the higher selfing rate in small sparse patches is likely a by-product of the pollination context (higher facilitated selfing and lower mate availability) instead of higher ability to self-fertilize. In large dense patches, the level of selfing rate could be attributable to unavoidable geitonogamous selfing (Porcher and Lande 2005a). Moreover, the lower visitation rate could reduce facilitated selfing in those

patches. The evolutionary outcomes of *R. ferrugineum* sparse populations will depend on the fitness of selfed versus outcrossed progenies, i.e. on the strength of inbreeding depression.

Inbreeding depression

First, despite the increase in seed production associated with selfing, the mean fruit set decreased significantly with decreasing patch floral display suggesting higher early acting inbreeding depression on fruit set in small sparse patches (Husband and Schemske 1996; Hokanson and Hancock 2000). SC index (mean of 0.7) showed partial self-incompatibility or early inbreeding depression limiting the full production of seeds via autogamy (Lloyd and Schoen 1992). The variability of SC among individuals (CV of 47%) suggested that partial self-sterility was due to early ID (Waser and Price 1991). Early ID has been previously shown in the Ericaceae family (Mahy and Jacquemart 1998, 1999).

Second, life time estimate of ID was strong (mean of 0.9) and significantly above the threshold value 0.5 favoring selfing. Inbreeding in mature plants was very low and almost always lower than it should be given the level of selfing estimated from progeny array analysis. This suggests that very few selfed progeny survived to maturity. Perennials species accumulate somatic mutation during their life cycle resulting in high sensitivity to inbreeding depression (Morgan et al. 1997; Petit and Hampe 2006), but see (Morgan 2001). In such species, ID is accumulating through the life time (at least 300 years for *R. ferrugineum*; Escaravage et al. 1998) which results in an increase of the selection against selfed-progeny. Indeed, ID in perennials has been reported to be high (e.g. Sorensen 1999; Kittelson and Maron 2000; Gonzalez-Varo and Traveset 2010).

Since ID did not vary along the floral display gradient, higher selfing rate in small sparse patches should be costly to *R. ferrugineum* and counteract the selective pressure towards selfing such as outcross pollination failure. Seed and pollen discounting may additionally counterbalance the automatic advantage of selfing (Herlihy and Eckert 2002; Vaughton and Ramsey 2010). Therefore the non-adaptive value of selfing could result in a decrease in population size and may endanger on the long run the survival of small and sparse populations. Anthropogenic disturbances are expected to strongly impact the evolutionary outcomes of plant mating system through outcross pollination failure resulting from mate and/or pollinator reduced availability (Eckert et al. 2010). However, our results suggest that the expected evolution of selfing to cope with outcross pollen limitation can be prevented by strong inbreeding depression.

Moreover, simultaneous display of many flowers may enhance pollinator attraction but exemplifies the conflict between self and cross fertilization (Barrett et al. 1994; Harder and Barrett 1995). Increased visitation rates may result in higher levels of pollinator-mediated self-pollination, both within and among flowers (de Jong et al. 1993; Snow et al. 1996). This could be costly in terms of lost mating opportunities if selfing decreased outcrossed siring success (pollen discounting; Holsinger 1991a) or ovule cross-fertilization (seed discounting; Llyod 1992). The cost of gamete discounting is dependent on self-progeny *versus* outcross-progeny viability (Charlesworth and Charlesworth 1987). In *R. ferrugineum*, the massive number of flowers and predisposition to facilitated autogamy through buzz pollination unavoidably increase selfing both via autogamy and geitonogamy. Both early and lifetime ID contributed to the maintenance of genetic diversity within patches while *R. ferrugineum* still benefit from the advantage of massive flowering and buzz pollination to improve pollinator attraction and pollen delivery. Therefore, early and lifetime ID may have been selected in mass-flowering species to cope with unavoidable pollinator-mediated selfing.

Mixed mating system and inbreeding depression

Rhododendron ferrugineum realized mating system was mixed ($0.2 < t_m < 0.8$; mean of 0.51) and t_m was lower than other Ericaceae species (mean of 0.8 in *R. aureum*, (Hirao et al. 2006) and *Calluna vulgaris*, Mahy and Jacquemart 1998). High ID associated to mixed mating system has been previously reported in several species (reviewed by Goodwillie et al. 2005; Winn et al. 2011). Yet, the understanding of how mixed mating can be stable is still a major scientific challenge in evolutionary biology. Theory predicts the decrease of ID as selfing rate increase through the purge of deleterious recessive alleles (Husband and Schemske 1996; Ritland 1996). High inbreeding depression despite high selfing rate (more than 0.5 in small and sparse *R. ferrugineum* patches) can occur when genetic load is due to mildly deleterious alleles at multiple loci (Kohn 1988; Latta and Ritland 1993). More specifically, selective interference has been proposed to result in the maintenance of mixed mating system despite high ID (>0.5) because it counteracts the purging process (Winn et al. 2011). When reduced fitness of selfed-progeny is due to the joint effect of deleterious mutations at multiple loci, selection against deleterious mutations at the homozygous state is not possible (i.e. selective interference; Lande et al. 1994). Purge process is therefore not possible under substantial rate of selfing (Porcher and Lande 2005a). Moreover, selective interference is likely in perennials species such as *R. ferrugineum* since this character enhances mutation rate per generation (Scofield and Schultz 2006). Both the high lifetime ID level and the early inbreeding

depression acting on selfed zygotes and on the proportion of viable fruits are expected when selective interference occurs (Winn et al. 2011).

Additionally, mixed mating system can be maintained by the ecological context, i.e. the relative proportion of self *versus* cross pollen reaching the stigmas (Goodwillie et al. 2005). Pollen and seed discounting, RA and biparental inbreeding may be responsible for stable mixed mating system (Holsinger 1991b; Porcher and Lande 2005b). RA can outweigh the disadvantage of inbreeding depression (ID) when outcross success is limited by low pollinator and/or mate availability (Lloyd 1992; Schoen et al. 1996). Here, RA may not be associated with seed discounting since the seed production is likely to be limited by outcross pollen availability (mean pollinator-mediated seed set is 0.49 versus 0.72 for pollen supplemented flowers). Moreover, we found evidence of mating between close relatives suggesting reduced pollen transfer distance and seed dispersion. Both biparental inbreeding and RA may contribute to the maintenance of stable intermediate selfing rate in *R. ferrugineum*.

Conclusion

The magnitude of lifetime ID has important implication for the evolutionary consequences of pollination failure. Indeed the trajectory a population takes following disturbance can depend on the strength of ID and on the relative evolvability of traits promoting allogamy *versus* autogamy (Eckert et al. 2010). Here, we showed the non-adaptive value of selfing in small sparse population of a mass-flowering shrub. Strong ID may be due to perennial characteristics of the focal species, selective interference and/or RA which maintain strong ID despite substantial selfing. ID allowed the maintenance of high genetic diversity in mature plants and counterbalanced the cost of the massive number of flowers likely enhancing selfing through geitonogamy. However, in small sparse patches where selfing rate was higher than 0.5, high ID may compromise in the long run survival of populations.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank P. Buscail, M. Ferval, and L. Verneuil for help with data collection and C. Le Corre for help with DNA extraction. This work was supported by La Fondation Pour la Recherche sur la Biodiversité (COMBIO project N° AAP-IN-2009-013) and a French Ministry grant to CELD. This work is part of the "Laboratoire d'Excellence (LABEX)" entitled TULIP (ANR -10-LABX-41).

LITERATURE CITED

- Agren, J., and D. W. Schemske. 1993. Outcrossing rate and inbreeding depression in two annual monoecious herbs, *Begonia hirsuta* and *B. seminovata*. *Evolution* 47:125-135.
- Barrett, S. C. H., and D. Charlesworth. 1991. Effects of a change in the level of inbreeding on the genetic load. *Nature* 352:522-524.
- Barrett, S. C. H., L. D. Harder, and W. W. Cole. 1994. Effects of flower number and position on self-fertilization in experimental populations of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Funct. Ecol.* 8:526-535.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, and F. Bonhomme. 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Biesmeijer, J. C., S. P. M. Roberts, M. Reemer, R. Ohlemuller, M. Edwards, T. Peeters, A. P. Schaffers, S. G. Potts, R. Kleukers, C. D. Thomas, J. Settele, and W. E. Kunin. 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313:351-354.
- Byers, D. L., and D. M. Waller. 1999. Do plant populations purge their genetic load? Effects of population size and mating history on inbreeding depression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30:479-513.
- Charlesworth, D., and B. Charlesworth. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*:237-268.
- Cheptou, P. O., and K. Donohue. 2010. Environment-dependent inbreeding depression: its ecological and evolutionary significance. *New Phytol.* 189:395-407.
- Cheptou, P. O., J. Lepart, and J. Escarre. 2002. Mating system variation along a successional gradient in the allogamous and colonizing plant *Crepis sancta* (Asteraceae). *J. Evol. Biol.* 15:753-762.
- Cruden, R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31:32-46.
- Darwin, C. 1876. The effects of cross and self fertilization in the vegetable kingdom. John Murray, London, UK.
- David, P., B. Pujol, F. Viard, V. Castella, and J. Goudet. 2007. Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Mol. Ecol.* 16:2474-2487.
- de Jong, T. J., N. M. Waser, and P. G. L. Klinkhamer. 1993. Geitonogamy: The neglected side of selfing. *Trends Ecol. Evol.* 8:321-325.
- Delmas, C. E. L., E. Lhuiller, A. Pornon, and N. Escaravage. 2011. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) using pyrosequencing technology. *Am. J. Bot.* 98:e120-e122.
- Dendauw, J., J. De Riek, P. Arens, E. Van Bockstaele, B. Vosman, and M. De Loose. 2001. Development of sequenced tagged microsatellite site (STMS) markers in *Azalea*. Pp. 193-197. Proceedings of the International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture.
- Eckert, C. G., and C. R. Herlihy. 2004. Using a cost-benefit approach to understand the evolution of self-fertilization in plants: the perplexing case of *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae). *Plant Science Biology* 19:159-173.
- Eckert, C. G., S. Kalisz, M. A. Geber, R. Sargent, E. Elle, P. O. Cheptou, C. Goodwillie, M. O. Johnston, J. K. Kelly, D. A. Moeller, E. Porcher, R. H. Ree, M. Vallejo-Marin, and A. A. Winn. 2010. Plant mating systems in a changing world. *Trends Ecol. Evol.* 25:35-43.
- Eckert, C. G., K. E. Samis, and S. Dart. 2006. Reproductive assurance and the evolution of uniparental reproduction in flowering plants. Pp. 183-203 in L. D. Harder, and S. C. H. Barrett, eds. *Ecology and Evolution of Flowers*. Oxford University Press.
- Escaravage, N., A. Pornon, B. Doche, and I. TillBottraud. 1997. Breeding system in an alpine species: *Rhododendron ferrugineum* L (Ericaceae) in the French northern Alps. *Can. J. Bot.* 75:736-743.
- Escaravage, N., S. Questiau, A. Pornon, B. Doche, and P. Taberlet. 1998. Clonal diversity in a *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) population inferred from AFLP markers. *Mol. Ecol.* 7:975-982.
- Escaravage, N., and J. Wagner. 2004. Pollination effectiveness and pollen dispersal in a *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) population. *Plant Biology* 6:606-615.
- Fisher, R. A. 1941. Average excess and average effect of a gene substitution. *Annals of Eugenics* 11:53-63.
- Franceschinelli, E. V., and K. S. Bawa. 2000. The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity* 84:116-123.
- Gonzalez-Varo, J. P., and A. Traveset. 2010. Among-individual variation in pollen limitation and inbreeding depression in a mixed-mating shrub. *Annals of Botany* 106:999-1008.
- Goodwillie, C., S. Kalisz, and C. G. Eckert. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:47-79.
- Harder, L. D., and S. C. H. Barrett. 1995. Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. *Nature* 373:512-515.

- Hedrick, P. W., and S. T. Kalinowski. 2000. Inbreeding depression in conservation biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31:139-162.
- Herlihy, C. R., and C. G. Eckert. 2002. Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilizing plant. *Nature* 416:320-323.
- Hirao, A. S., Y. Kameyama, M. Ohara, Y. Isagi, and G. Kudo. 2006. Seasonal changes in pollinator activity influence pollen dispersal and seed production of the alpine shrub *Rhododendron aureum* (Ericaceae). *Mol. Ecol.* 15:1165-1173.
- Hokanson, K., and J. Hancock. 2000. Early-acting inbreeding depression in three species of *Vaccinium* (Ericaceae). *Sex. Plant Reprod.*:145-150.
- Holsinger, K. E. 1991a. Inbreeding depression and the evolution of plant mating systems. *Trends Ecol. Evol.* 6:307-308.
- Holsinger, K. E. 1991b. Mass-action models of plant mating systems: the evolutionary stability of mixed mating systems. *Am. Nat.* 138:606-622.
- Holsinger, K. E. 1996. Pollination biology and the evolution of mating systems in flowering plants. Pp. 107-149. *Evolutionary Biology*, Vol 29.
- Husband, B. C., and D. W. Schemske. 1996. Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* 50:54-70.
- Jarne, P., and P. David. 2008. Quantifying inbreeding in natural populations of hermaphroditic organisms. *Heredity* 100:431-439.
- Johnston, M. O., E. Porcher, P. O. Cheptou, C. G. Eckert, E. Elle, M. A. Geber, S. Kalisz, J. K. Kelly, D. A. Moeller, M. Vallejo-Marin, and A. A. Winn. 2009. Correlations among Fertility Components Can Maintain Mixed Mating in Plants. *Am. Nat.* 173:1-11.
- Karron, J. D., N. N. Thumser, R. Tucker, and A. J. Hessenauer. 1995. The influence of population density on outcrossing rates in *Mimulus ringens*. *Heredity* 75:175-180.
- Kittelson, P. M., and J. L. Maron. 2000. Outcrossing rate and inbreeding depression in the perennial yellow bush lupine, *Lupinus arboreus* (Fabaceae). *Am. J. Bot.* 87:652-660.
- Kohn, J. R. 1988. Why be female? *Nature* 335:431-433.
- Lande, R., and D. W. Schemske. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. 1. Genetics models. *Evolution* 39:24-40.
- Lande, R., D. W. Schemske, and S. T. Schultz. 1994. High inbreeding depression, selective interference among loci, and the threshold selfing rate for purging recessive lethal mutations. *Evolution* 48:965-978.
- Latta, R., and K. Ritland. 1993. Models for the evolution of selfing under alternative modes of inheritance. *Heredity* 71:1-10.
- Lloyd, D. G. 1979. Some reproductive factors affecting the selection of self-fertilization in plants. *Am. Nat.* 113:67-79.
- Lloyd, D. G. 1992. Self-and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *Int. J. Plant Sci.* 153:370-380.
- Lloyd, D. G., and D. J. Schoen. 1992. Self-and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *Int. J. Plant Sci.* 153:358-369.
- Lloyd, D. G. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *Int. J. Plant Sci.* 153:370-380.
- Loreau, M., S. Naeem, P. Inchausti, J. Bengtsson, J. P. Grime, A. Hector, D. U. Hooper, M. A. Huston, D. Raffaelli, B. Schmid, D. Tilman, and D. A. Wardle. 2001. Ecology - Biodiversity and ecosystem functioning: Current knowledge and future challenges. *Science* 294:804-808.
- Mahy, G., and A. L. Jacquemart. 1998. Mating system of *Calluna vulgaris*: self-sterility and outcrossing estimations. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 76:37-42.
- Mahy, G., and A. L. Jacquemart. 1999. Early inbreeding depression and pollen competition in *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Annals of Botany* 83:697-704.
- Moeller, D. A., and M. A. Geber. 2005. Ecological context of the evolution of self-pollination in *Clarkia xantiana*: Population size, plant communities, and reproductive assurance. *Evolution* 59:786-799.
- Morgan, M. T. 2001. Consequences of life history for inbreeding depression and mating system evolution in plants. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268:1817-1824.
- Morgan, M. T., D. J. Schoen, and T. M. Bataillon. 1997. The evolution of self-fertilization in perennials. *Am. Nat.* 150:618-638.
- Naito, K., Y. Isagi, and N. Nakagoshi. 1998. Isolation and characterization of microsatellites of *Rhododendron metternichii* Sieb. et Zucc. var. *hondoense* Nakai. *Mol. Ecol.* 7:927-928.
- Ozenda, P. 1985. La végétation de la chaîne alpine dans l'espace montagnard européen. Masson, Paris.
- Petit, R. J., and A. Hampe. 2006. Some evolutionary consequences of being a tree. Pp. 187-214. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*

- Porcher, E., J. K. Kelly, P. O. Cheptou, C. G. Eckert, M. O. Johnston, and S. Kalisz. 2009. The genetic consequences of fluctuating inbreeding depression and the evolution of plant selfing rates. *J. Evol. Biol.* 22:708-717.
- Porcher, E., and R. Lande. 2005a. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression under pollen discounting and pollen limitation. *J. Evol. Biol.* 18:497-508.
- Porcher, E., and R. Lande. 2005b. Reproductive compensation in the evolution of plant mating systems. *New Phytol.* 166:673-684.
- Pornon, A., N. Escaravage, I. TillBottraud, and B. Doche. 1997. Variation of reproductive traits in *Rhododendron ferrugineum* L (Ericaceae) populations along a successional gradient. *Plant Ecol.* 130:1-11.
- Ritland, K. 1989. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. *Evolution* 43:848-859.
- Ritland, K. 1990. Inferences about inbreeding depression based on changes of the inbreeding coefficient. *Evolution* 44:1230-1241.
- Ritland, K. 1996. Inferring the genetic basis of inbreeding depression in plants. *Genome* 39:1-8.
- Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity* 88:221-228.
- Ritland, K., and S. Jain. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity* 47:35-52.
- Roff, D. A. 1997. *Evolutionary Quantitative Genetics*. Chapman & Hall, New York.
- Routley, M. B., K. Mavraganis, and C. G. Eckert. 1999. Effect of population size on the mating system in a self-compatible, autogamous plant, *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae). *Heredity* 82:518-528.
- Schoen, D. J., M. T. Morgan, and 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* 351:1281-1290.
- Scofield, D. G., and S. T. Schultz. 2006. Mitosis, stature and evolution of plant mating systems: low-Phi and high-Phi plants. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273:275-282.
- Snow, A. A., T. P. Spira, R. Simpson, and R. A. Klips. 1996. The ecology of geitonogamous pollination. Pp. 191-216 in D. G. Llyod, and S. C. H. Barrett, eds. *Floral biology. Studies on floral evolution in animal-pollinated plants*. Chapman and Hall, New York, USA.
- Sorensen, F. C. 1999. Relationship between self-fertility, allocation of growth, and inbreeding depression in three coniferous species. *Evolution* 53:417-425.
- Sun, M., and K. Ritland. 1998. Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*), a successful colonizer in North America. *Heredity* 80:225-232.
- Vaughton, G., and M. Ramsey. 2010. Pollinator-mediated selfing erodes the flexibility of the best-of-both-worlds mating strategy in *Bulbine vagans*. *Funct. Ecol.* 24:374-382.
- Waser, N. M., and M. V. Price. 1991. Reproductive costs of selfpollination in *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae): are ovules usurped? *Am. J. Bot.* 78:1036-1043.
- Winn, A. A., E. Elle, S. Kalisz, P.-O. Cheptou, C. G. Eckert, C. Goodwillie, M. O. Johnston, D. A. Moeller, R. H. Ree, R. D. Sargent, and M. Vallejo-Marín. 2011. Analysis of inbreeding depression in mixed-mating plants provides evidence for selective interference and stable mixed mating. *Evolution*.

DISCUSSION GÉNÉRALE

SOMMAIRE – DISCUSSION GÉNÉRALE

PRÉAMBULE	- 153 -
1. IMPACT DE LA DISTRIBUTION SPATIALE D'UNE ESPÈCE À FLORAISON MASSIVE SUR LES INTERACTIONS PLANTES-POLLINISATEURS	- 155 -
1.1. <i>RHODODENDRON FERRUGINEUM</i> ET SA COMMUNAUTÉ ENVIRONNANTE : PARTAGE DES POLLINISATEURS.....	- 156 -
1.2. L'IMPACT DU GRADIENT DE FRAGMENTATION LOCALE SUR L'ASSEMBLAGE DES POLLINISATEURS.....	- 158 -
1.3. QUELLES CONSÉQUENCES SUR LE TAUX DE VISITES DE <i>R. FERRUGINEUM</i> : EFFET ALLEE OU COMPÉTITION INTRASPECIFIQUE ? - 161 -	
1.4. MAINTIEN DES POLLINISATEURS DANS LES PATCHS DE LANDE FRAGMENTÉS	- 161 -
2. CONSÉQUENCES POUR LA POLLINISATION ET LE SYSTÈME DE REPRODUCTION D'UNE ESPÈCE À FLORAISON MASSIVE	- 165 -
2.1. LIMITATION EN POLLINISATEURS <i>VERSUS</i> LIMITATION EN PARTENAIRES POUR LA REPRODUCTION.....	- 165 -
2.2. L'ASSURANCE DE REPRODUCTION : LE RÔLE DE L'AUTOGAMIE FACILITÉE	- 168 -
2.3. VARIATION DES TAUX D'AUTOFÉCONDATION : CONTEXTE ÉCOLOGIQUE <i>VERSUS</i> TRAITS FLORAUX	- 171 -
2.4. QUELLE VALEUR ADAPTATIVE POUR L'AUTOFÉCONDATION ?	- 174 -
3. LE RÔLE DES CARACTÉRISTIQUES DE LA COMMUNAUTÉ ENVIRONNANTE DANS LES INTERACTIONS PLANTES-POLLINISATEURS	- 177 -
3.1. LA RICHESSE SPÉCIFIQUE ET LA DENSITÉ FLORALE DE LA COMMUNAUTÉ ENVIRONNANTE	- 177 -
3.2. LES RELATIONS PHYLOGÉNÉTIQUES AU SEIN DES LANDES À <i>R. FERRUGINEUM</i>	- 179 -
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	- 181 -

PRÉAMBULE

Au cours de ce travail, nous avons décrit les patrons spatiaux des landes à rhododendron en utilisant le degré d'isolement des patchs de landes et la répartition spatiale des ressources florales de *R. ferrugineum* au sein des patchs (voir le cadre de l'étude dans l'introduction).

Toutefois, l'isolement des patchs n'ayant d'effet que sur un nombre limité de variables (transfert de pollen et densité de pollinisateurs, voir chapitres 1 et 2), je discuterai principalement de l'effet du gradient de ressources florales de *R. ferrugineum* (ou **fragmentation locale** des patchs, terme que j'utiliserai tout au long de cette discussion générale) sur l'ensemble des variables réponses étudiées.



Site d'étude — Camurac (11, France)

1. IMPACT DE LA DISTRIBUTION SPATIALE D'UNE ESPÈCE À FLORAISON MASSIVE SUR LES INTERACTIONS PLANTES-POLLINISATEURS



Patch de lande à *R. ferrugineum* : « non fragmenté » (gauche) et « fragmenté » (droite)

L'objectif principal de cette thèse était de tester si la pollinisation (transfert de pollen par les pollinisateurs) est un facteur limitant la reproduction sexuée d'une espèce autocompatible à floraison massive en habitat fragmenté. Nous nous sommes attachés à mettre en évidence les causes et les conséquences de cette limitation, ainsi que les mécanismes pouvant permettre de la compenser.

Une première étape primordiale dans cet objectif a consisté à étudier le cortège de pollinisateurs de *R. ferrugineum* et de la communauté environnante au sein des patches et à examiner l'existence d'un partage des pollinisateurs entre ces deux « composantes » de la lande (rhododendron *versus* communauté environnante). La description de la répartition des pollinisateurs entre ces deux composantes est un pré requis primordial pour pouvoir comprendre l'effet des patrons spatiaux des communautés sur les interactions plantes-pollinisateurs. Pourtant, l'ampleur du partage des pollinisateurs entre espèces cofleurissantes n'est pas connue pour la plupart des communautés (Sargent & Ackerly, 2008).

1.1. *Rhododendron ferrugineum* et sa communauté environnante : partage des pollinisateurs

Rhododendron ferrugineum est principalement visité par *Bombus spp.* (Hymenoptera, figure 10). Les deux espèces les plus abondantes sont *Bombus soroeensis lectitatus* et *Bombus wurfleini pyrenaicus* (voir encadré 4). Nous remarquons que, selon l'étude des charges polliniques présentes sur le corps des insectes (chapitre 2), les bourdons portent environ 30 fois plus de grains de pollen de rhododendron (et 70 fois plus de grains de pollen au total) que les diptères (*Empis pandellei*). Sur notre site d'étude, **le transfert de pollen de notre espèce cible serait donc principalement effectué par *Bombus spp.*** (Escaravage & Wagner, 2004). Les variations de diversité et d'abondance des hyménoptères devraient ainsi avoir un impact important sur la pollinisation et le système de reproduction de *R. ferrugineum*. En revanche, la communauté environnante est principalement visitée par des diptères (figure 10¹¹).

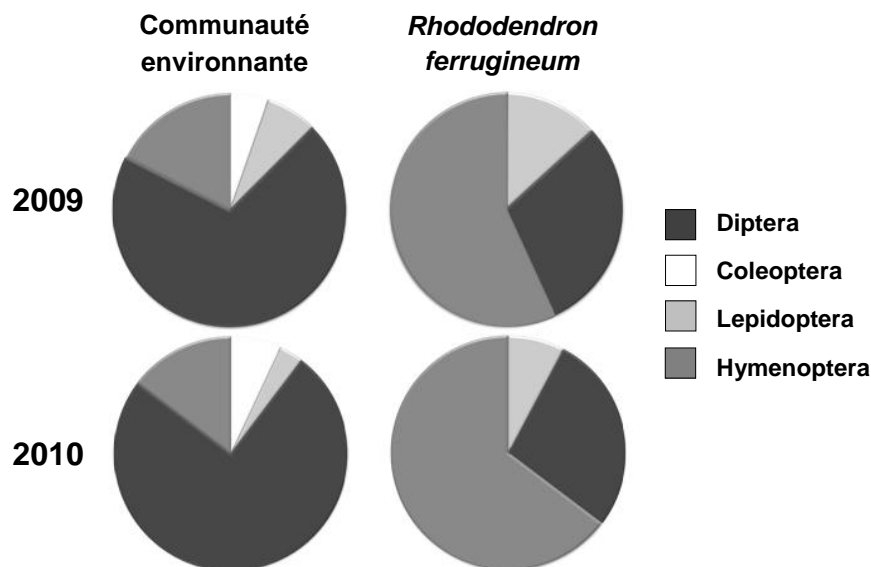


Figure 1. Composition de la communauté d'insectes visiteurs des fleurs des landes à rhododendron.

¹¹ La liste des espèces observées dans les landes à rhododendron est présentée en annexe 2

Une analyse multivariée¹² a permis de confirmer l'existence d'une différence significative entre l'assemblage de pollinisateurs visitant *R. ferrugineum* et celui visitant la communauté environnante (ANOVA ; $F = 23,39$; $P < 0,0001$). Toutefois, cette différence pourrait ne pas empêcher l'existence d'un partage de pollinisateurs entre *R. ferrugineum* et les plantes cofleurissantes.

D'une manière générale, seules cinq espèces de bourdons (Hymenoptera) et trois espèces de syrphes (Diptera) ont été observées uniquement sur notre espèce cible. Cependant, nous les avons observé/capturé en très faible abondance (un individu pour chaque espèce de syrphes et quatre individus maximum pour chaque espèce de bourdons, voir annexe 2), ce qui suggère que ces espèces sont rares (du moins au moment de la collecte). Les autres espèces ont toutes été observées butinant *R. ferrugineum* et les plantes de la communauté environnante (6,7 et 7,4 espèces visitées en moyenne par patch, en 2009 et 2010 respectivement).

La plupart des pollinisateurs seraient donc **généralistes**. En effet, 100 % des bourdons capturés sur *R. ferrugineum* (y compris ceux qui n'ont été observé que sur cette espèce) portent du pollen issu des plantes de la communauté environnante (chapitre 2), et 77 % des bourdons collectés sur la communauté environnante portent du pollen de rhododendron (annexe 1). Nous montrons donc qu'**il existe un partage de pollinisateurs important entre notre espèce cible et sa communauté environnante**. Ce résultat confirme la prépondérance de pollinisateurs généralistes dans les réseaux d'interactions (Waser, 1996). L'existence de ce partage rend donc possible des interactions de compétition ou de facilitation pour le service des pollinisateurs ainsi qu'un transfert de pollen hétérospécifique (Morales & Traveset, 2008).

Certains pollinisateurs généralistes (*Bombus spp.*), semblent avoir **un comportement plus constant que d'autres à l'égard de *R. ferrugineum***. Nous avons évalué la constance des pollinisateurs au cours d'une même séquence de collecte de ressources à partir : (i) des observations de visites aux plantes de la lande lors des transects d'observation¹³ (plusieurs espèces visitées *versus* uniquement *R. ferrugineum*), (ii) de l'étude des charges polliniques des pollinisateurs (bien qu'un faible échantillonnage de certaines espèces nous empêche de pouvoir conclure de façon certaine) et enfin sur (iii) des campagnes de capture-marquage-

¹² Analyse factorielle des correspondances.

¹³ Données tirées des transects d'observation réalisés au sein de chaque patch (méthode décrite dans les chapitres 1 et 2) pour lesquels nous avons relevés l'identité de chaque plante visitée.

recapture réalisée sur une partie du site d'étude¹⁴ (certains insectes marqués sur *R. ferrugineum* ont été recapturés sur d'autres espèces de plantes alors que d'autres ont été recapturés uniquement sur le rhododendron). Par exemple, *Bombus lapidarius*, *B. mesomelas* et *B. wurfleini* semblent avoir un comportement peu constant à l'égard de *R. ferrugineum* au cours d'une même séquence de collecte de ressources alors que *B. soroeensis* apparaît comme l'espèce la plus constante (voir encadré 4). Le transfert de pollen de *R. ferrugineum* pourrait être principalement réalisé par cette espèce.



Bombus ruderatus #59 sur *R. ferrugineum* *Bombus wurfleini* #5 sur *Ajuga reptans*

1.2. L'impact du gradient de fragmentation locale sur l'assemblage des pollinisateurs

Nous avons étudié l'effet du gradient de fragmentation locale sur le cortège de pollinisateurs afin d'identifier les variations potentielles de diversité et d'abondance des visiteurs principaux des landes (Hymenoptera, Diptera et Lepidoptera). La réponse des insectes pollinisateurs aux variations des patrons spatiaux de plantes dépend des besoins propres à chaque espèce ainsi que de leur comportement lors des séquences de collecte de ressources (Geber & Moeller, 2006).

L'abondance et la diversité des hyménoptères visitant *R. ferrugineum* diminuent significativement avec l'augmentation de la fragmentation locale des patches, et ce, pour les deux années étudiées (2009 et 2010 ; figure 11). Au contraire, l'abondance des diptères et

¹⁴ 301 bourdons ont été capturés et marqués soit sur *R. ferrugineum* soit sur la communauté environnante (20h de capture / marquage dans 8 patches) ; 232 actes de recapture ont été réalisés (dont 92 individus différents) au cours de transects de recaptures de 3 x 30 min par patch et entre chaque patch (n = 16 patches correspondant aux patches les plus proches de ceux dans lesquels ont été marqués les insectes, au-delà, aucun insecte marqué n'a été observé).

lépidoptères (diversité non estimée), pollinisateurs principaux de la communauté environnante, n'est pas affectée par la distribution spatiale de *R. ferrugineum*. Ce résultat confirme la **forte sensibilité des hyménoptères aux variations locales de communautés de plantes** (Cresswell & Osborne, 2004; Diekotter *et al.*, 2007).

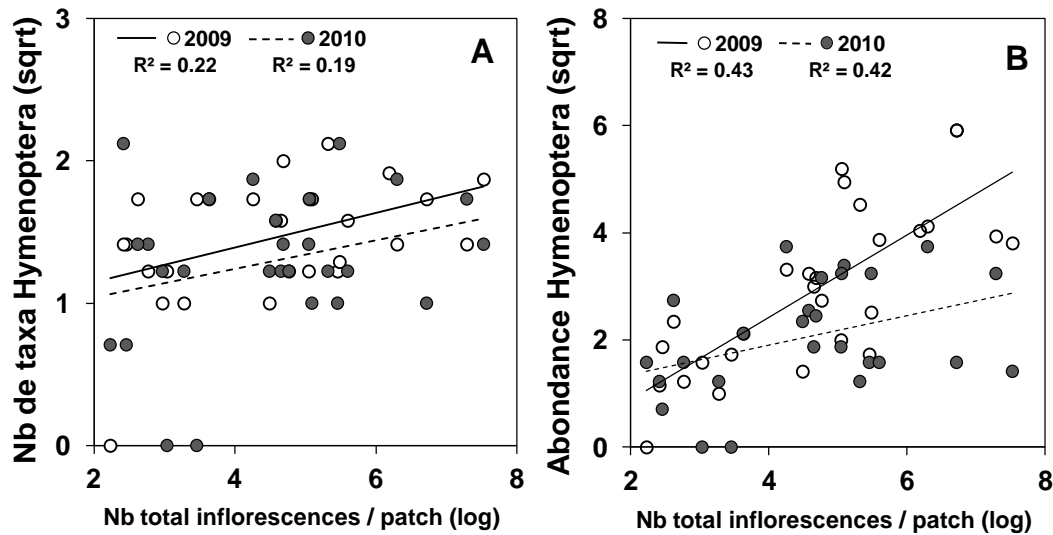


Figure 11. Effet de la quantité de ressources florales de *R. ferrugineum* au sein des patchs (nombre total d'inflorescences de *R. ferrugineum*) sur (A) la diversité des Hyménoptera (nombre de taxa) et (B) l'abondance des Hyménoptera visitant *R. ferrugineum*. L'abondance et la diversité sont transformées par la racine carrée.

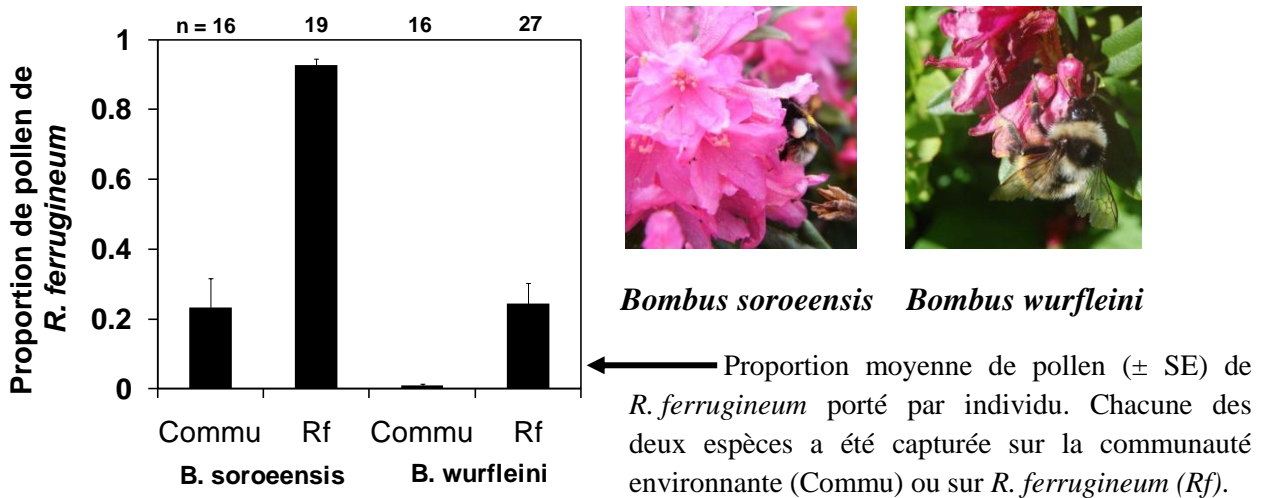
La méthode est décrite dans le chapitre 1. Les relations significatives ($P < 0.05$) sont indiquées par la présence de droites de régression.

Tout pollinisateur confondu, le nombre de plantes visitées dans la communauté environnante¹⁵ ne varie pas avec le gradient de fragmentation locale. Cependant, cela ne signifie pas que la quantité relative de visites réalisées aux espèces de la lande, ainsi que les flux de pollen conspécifique et hétérospécifique demeurent identiques. D'après nos observations de terrain, **les patchs les plus fragmentés seraient visités par des bourdons dont le comportement n'est pas constant à l'égard de *R. ferrugineum*** (*B. Lapidarius* et *B. mesomelas* notamment), en plus des visites de pollinisateurs constants tels que *B. soroensis*.

¹⁵ Données tirées des transects d'observation réalisés au sein de chaque patch (méthode décrite dans les chapitres 1 et 2) durant lesquels nous avons relevé l'identité de chaque plante visitée.

Encadré 4 : Tricheur ou pollinisateur? L'évidence des charges polliniques

Deux espèces de bourdons généralistes représentent à elles seules entre 40 et 50 % des visites à *R. ferrugineum* (selon l'année). *B. soroensis lectitatus* fait vibrer les étamines à déhiscence poricide de *R. ferrugineum* lorsqu'il visite les fleurs, provoquant ainsi une libération importante de pollen. Durant l'expérimentation de capture-marquage-recapture, aucun individu de cette espèce ayant été marqué sur le rhododendron a été recapturé dans la communauté environnante, ce qui indique que *B. soroensis* change très peu d'espèce hôte durant une même séquence de collecte de ressources. *B. wurfleini pyrenaicus*, lorsqu'il collecte le nectar du rhododendron, perce les corolles et récolte le nectar sans entrer en contact avec les pièces fertiles mâles ou femelles (il entre cependant dans les corolles lorsqu'il collecte le pollen).



L'étude des charges polliniques confirme la différence de comportement de ces deux espèces. *Bombus soroensis* porte en moyenne 93% de pollen de *R. ferrugineum* lorsqu'il est capturé sur celui-ci et 23% lorsqu'il est capturé dans la communauté environnante, ce qui confirme sa tendance à être constant à l'égard de *R. ferrugineum* dans une même période de vol. Les charges polliniques de *B. wurfleini* confirment son comportement de tricheur, puisqu'il ne porte en moyenne que 24% de pollen de *R. ferrugineum* lorsqu'il est capturé sur cette espèce (s'il entre dans la corolle ou la perce indifféremment). *Bombus soroensis*, de par sa forte abondance, sa capacité à réaliser de la « buzz pollination » et son comportement constant, possède toutes les caractéristiques pour être le pollinisateur le plus efficace de notre espèce cible.

1.3. Quelles conséquences sur le taux de visites de *R. ferrugineum* : effet Allee ou compétition intraspécifique ?

Le taux de visites par fleur et la densité de pollinisateurs augmentent significativement avec la fragmentation locale des landes (chapitres 1 et 2). **Chez cette espèce à floraison massive, nous n'observons donc pas d'effet Allee** (relation positive entre le taux de visites et la densité florale), comme décrit pour d'autres espèces en habitat fragmenté (Cheptou & Avendano, 2006). Au contraire, nous observons **une forte compétition intraspécifique pour les services de pollinisation** (Harder & Barrett, 1995; Snow *et al.*, 1996). La disponibilité en fleurs augmentant relativement plus vite que le nombre de visiteurs, les pollinisateurs sont « dilués » dans les grands patchs où les ressources florales de *R. ferrugineum* sont très abondantes. Plusieurs études expérimentales ont mis en évidence que la proportion de fleurs visitées sur un individu par chaque insecte augmente avec l'isolement (Kunin, 1993; 1997). Cette tendance a également été observée en population naturelle (Ghazoul *et al.*, 1998; Bosch & Waser, 1999; Schulke & Waser, 2001). Dans notre cas, les pollinisateurs ne visitent pas plus de fleurs chez les individus les plus isolés que chez les individus des patchs non fragmentés (la tendance est d'ailleurs opposée, $P = 0.06^{16}$). L'augmentation du taux de visites et de la densité des pollinisateurs qui accompagne la fragmentation locale des landes serait donc due à la réduction de la quantité de fleurs disponibles plutôt qu'à un changement de comportement des pollinisateurs.

1.4. Maintien des pollinisateurs dans les patchs de lande fragmentés

L'augmentation du taux de visites et de la densité des pollinisateurs de *R. ferrugineum* ne peut être possible que si les pollinisateurs du rhododendron continuent à visiter cette espèce dans les patchs les plus fragmentés. Comme nous l'avons vu ci-dessus, les patchs les plus fragmentés seraient visités entre autres par des bourdons dont le comportement est moins constant à l'égard de *R. ferrugineum*. En effet, chaque pollinisateur (*Bombus spp.*) capturé sur notre espèce cible porte en moyenne une proportion plus faible de pollen de rhododendron dans les plus petits patchs (chapitre 2) suggérant une augmentation du partage des pollinisateurs entre *R. ferrugineum* et sa communauté environnante dans cette partie du

¹⁶ Régression entre le nombre de fleurs visitées par chaque insecte (mesuré au cours des observations de taux de visites durant 10 min / individu) et le gradient de ressources florales.

gradient. Cependant, il est important de rappeler que si le partage entre *R. ferrugineum* et sa communauté environnante semble augmenter dans les patchs les plus petits, le nombre de plantes visitées dans la communauté environnante ne varie pas en fonction du gradient de fragmentation locale.

L'augmentation du taux de visites et de la densité des pollinisateurs de *R. ferrugineum* dans les patchs les plus fragmentés est donc probablement facilitée par les ressources florales disponibles pour les insectes dans la communauté environnante.

De plus, nos résultats suggèrent que **les espèces à floraison massive sont capables de monopoliser les pollinisateurs de la communauté**. Ce résultat est particulièrement probant dans les patchs les plus fragmentés où notre espèce cible occupe un faible espace au sein des patchs (figure 12, chapitre 1). Par exemple, lorsque *R. ferrugineum* occupe 20 % du patch, nous avons observé significativement plus de 20 % des insectes visitant cette espèce. De la même manière, la proportion moyenne de pollen conspécifique portée par chaque insecte est supérieure à la proportion de lande recouverte par *R. ferrugineum* (chapitre 2). La floraison massive de notre espèce cible attire les pollinisateurs de par l'abondance des ressources offertes et de par la visibilité des nombreuses fleurs de couleur rouge-rose vif dans la végétation environnante (Spaethe *et al.*, 2001). Cette forte attractivité permet donc à ce type d'espèce de limiter les conséquences négatives de l'isolement sur l'abondance des insectes pollinisateurs et pourrait expliquer le maintien des pollinisateurs de *R. ferrugineum* sur les individus isolés.

Rhododendron ferrugineum pourrait donc être considéré comme une espèce « aimant » (*magnet species*, Thomson 1978), dont la forte attractivité bénéficierait aux plantes de la communauté environnante les plus proches (Laverty, 1992; Geer *et al.*, 1995; Moeller, 2004; Ghazoul, 2006). On peut donc émettre l'hypothèse d'une relation source-puits entre les insectes pollinisateurs de *R. ferrugineum* et de la communauté environnante. Nous avons montré que la densité de pollinisateurs visitant *R. ferrugineum* augmente avec l'augmentation de la fragmentation locale des patchs alors que la densité des pollinisateurs dans la communauté environnante diminue (chapitre 1).

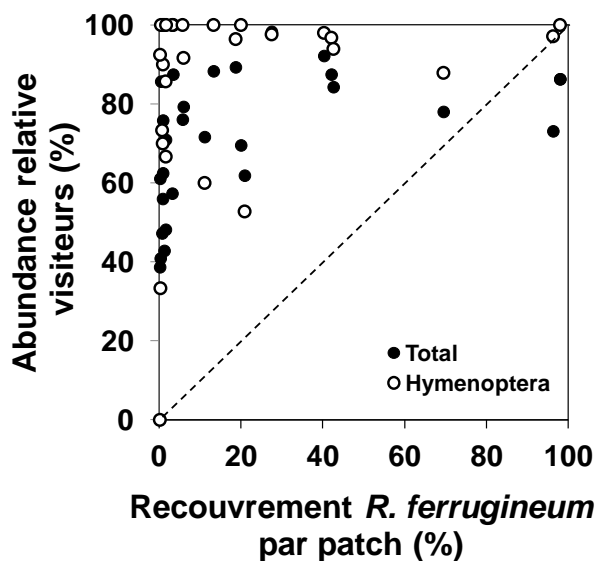


Figure 2. Relation entre la proportion de visiteurs observés sur *R. ferrugineum* et la proportion de lande occupée par celui-ci dans chaque patch ($n = 28$). Au-dessus de la ligne en pointillée, la proportion de visiteurs observée est supérieure à la proportion de rhododendron. Les données représentées sont issues des relevés de 2009. Figure tirée du chapitre 1. La même tendance a été observée en 2010.

Bien que ce résultat soit issu d'observations de terrain et ne puisse être interprété comme une relation de cause à effet, nous pouvons émettre l'hypothèse que **la communauté environnante joue le rôle de source d'insectes pollinisateurs pour les individus isolés de *R. ferrugineum*** qui, comme nous l'avons évoqué, monopolisent les insectes de la lande. Dans les patches les plus fragmentés, les insectes se déplaceraient donc de façon plus fréquente de la communauté environnante vers le rhododendron, que l'inverse (figure 13). Les résultats issus de l'étude des charges polliniques portées par les bourdons capturés dans les patches de lande fragmentés (sur le rhododendron et dans la communauté environnante) vont dans le sens de cette hypothèse. Les pollinisateurs (*Bombus spp.*) capturés sur *R. ferrugineum* dans les patches de lande les plus fragmentés portent une proportion importante de pollen issu de la communauté environnante (environ 40 %, chapitre 2) alors qu'à l'inverse, les pollinisateurs capturés dans la communauté environnante portent une proportion extrêmement faible de pollen de rhododendron (environ 3 %, annexe 1). Ces deux résultats confirmeraient l'existence d'un transfert d'insectes de la communauté (source) vers *R. ferrugineum* (puits) dans les patches les plus fragmentés.

De l'autre côté du gradient de fragmentation locale, où le rhododendron occupe la majeure partie des patches, c'est ce dernier qui jouerait le rôle de « source » de pollinisateurs pour la communauté environnante (voir figure 13). En effet, les bourdons capturés dans la communauté environnante des plus grands patches portent une proportion non négligeable de pollen de rhododendron (environ 34 %, annexe 1) alors que les pollinisateurs capturés sur le rhododendron porte peu de pollen de la communauté environnante (environ 24 %, chapitre 2).

Ce résultat confirmerait l'existence d'un transfert de pollinisateurs de *R. ferrugineum* (source) vers la communauté environnante (puits) dans les plus grands patches.

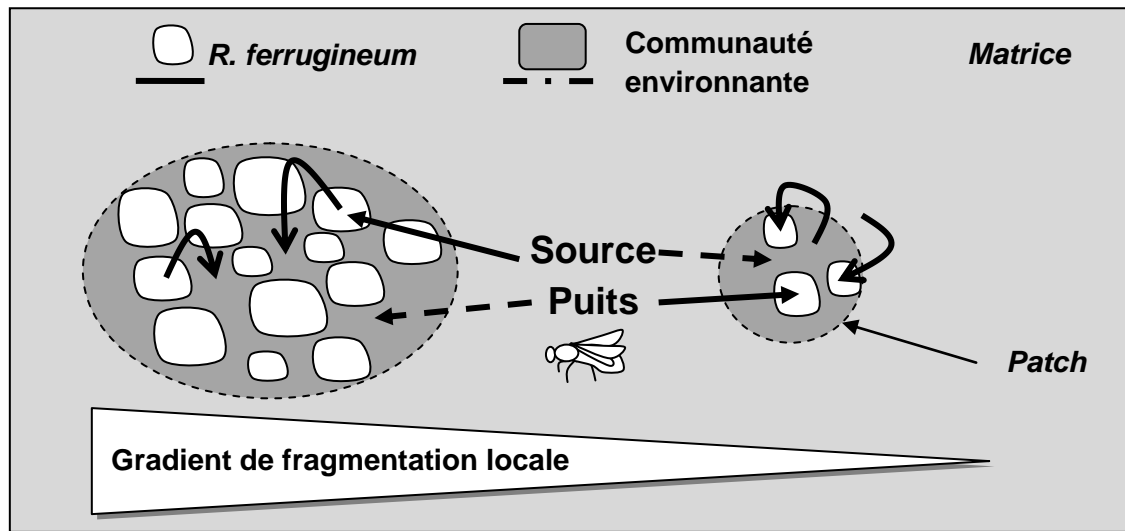
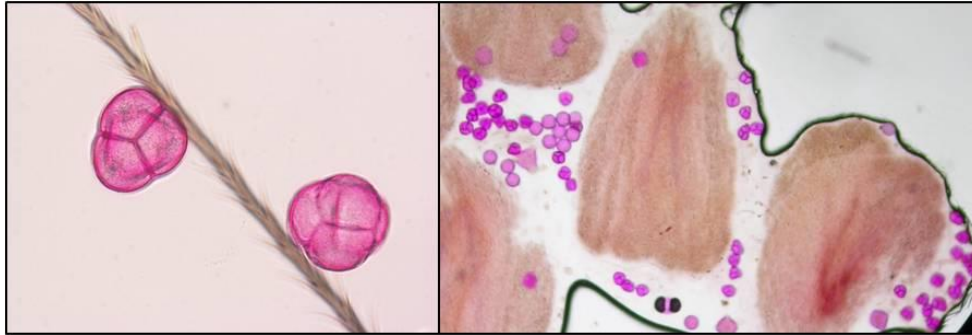


Figure 13. Schéma représentatif de l'hypothèse d'une relation source/puits entre *R. ferrugineum* et la communauté environnante.

Pour les espèces à floraison massive comme *R. ferrugineum*, **le taux de visites est déterminé par la compétition intraspécifique** (Eckert, 2000) et non par l'effet Allee. La forte attractivité des individus isolés entraîne **la monopolisation des pollinisateurs de la communauté**, pouvant permettre de compenser les conséquences négatives de l'isolement sur l'abondance et la diversité des pollinisateurs. Ce mécanisme est possible grâce à la présence d'une communauté environnante riche en plantes entomogames qui permet aux pollinisateurs de *R. ferrugineum* de se maintenir dans les patches les plus fragmentés. Selon l'ampleur du flux de pollen hétérospécifique, *R. ferrugineum* pourrait bénéficier du « soutien » des espèces cofleurissantes dans les patches les plus fragmentés. **La pollinisation pourrait donc être limitée par les pollinisateurs dans les grands patches et par la disponibilité en plantes conspécifiques dans les petites patches** où la quantité de pollen conspécifique disponible pourrait ne pas permettre à chaque fleur de recevoir assez de pollen compatible, et ce, malgré l'augmentation du taux de visites (Kunin, 1993; Duncan *et al.*, 2004; Wagenius & Lyon, 2010).

2. CONSÉQUENCES POUR LA POLLINISATION ET LE SYSTÈME DE REPRODUCTION D'UNE ESPÈCE À FLORAISON MASSIVE



Tétrades de *R. ferrugineum* (x1000) Papilles stigmatiques – *R. ferrugineum* (x250)
Pollen coloré à l'aide de Fuchsine

Malgré l'augmentation du taux de visites par fleur et de la densité des pollinisateurs dans les patchs les plus fragmentés, le service des pollinisateurs (limitation en transfert de pollen, PTL; voir encadré 1) est identique le long du gradient de fragmentation locale (chapitres 1 et 4). **Le transfert de pollen limite la reproduction de *R. ferrugineum* de 30 % en moyenne.** Peu d'études ont étudiée la PTL chez des espèces autocompatibles et aucune à ma connaissance ne l'ont étudié dans différents contextes écologiques (disponibilité en plantes conspécifiques contrastées). Les niveaux de PTL¹⁷ documentés sont de l'ordre de 0-0,15 chez *Collinsia verna* (Kalisz *et al.*, 2004), de 0,28, 0,57 et 0,91 chez trois espèces de *Centaurium* (Brys & Jacquemyn, 2011) et de 0,118 chez *Kosteletzkya virginica* (Ruan *et al.*, 2010).

2.1 Limitation en pollinisateurs versus limitation en partenaires pour la reproduction

Il semble que la limitation en pollinisateurs dans les grands patchs et la limitation en plantes conspécifiques dans les patchs les plus fragmentés se contrebalancent le long du gradient de fragmentation locale, maintenant ainsi un transfert de pollen limité et identique quel que soit le taux de visite. En effet, la quantité de pollen conspécifique (rhododendron) portée par

¹⁷ Dans la littérature, l'indice « PTL » a été jusqu'alors appelée limitation en pollinisateurs (« *pollinator failure* »). L'utilisation de ce terme n'est cependant pas adaptée lorsque cet indice est positif car la quantité de plantes conspécifiques disponibles ne permet pas un transfert de pollen optimal mais que les pollinisateurs sont présents. Nous avons donc choisi d'utiliser le terme « limitation en transfert de pollen ».

chaque insecte visitant *R. ferrugineum* est plus faible lorsque la densité en insectes visitant cette espèce est élevée (chapitre 2). Par conséquent, il est possible que l'augmentation du taux de visites par fleurs dans les patchs les plus fragmentés soit compensée par une plus faible quantité de pollen conspécifique transportée par chaque insecte. À l'inverse, dans les plus grands patchs, le taux de visites est réduit mais chaque insecte porte une quantité plus importante de pollen conspécifique du fait de la faible densité en visiteurs. Ce résultat pourrait expliquer la similarité de la quantité de pollen conspécifique présente sur les stigmates (chapitre 2) et de la PTL le long du gradient (chapitres 1 et 4). Cependant, les tests de pollinisation (dont la mesure de PTL) et de charges polliniques n'ont pas été réalisés la même année (2009 et 2010 respectivement), ce qui empêche l'interprétation d'une relation de cause à effet directe entre le pollen transporté par les pollinisateurs et déposé sur les stigmates et le degré de PTL.

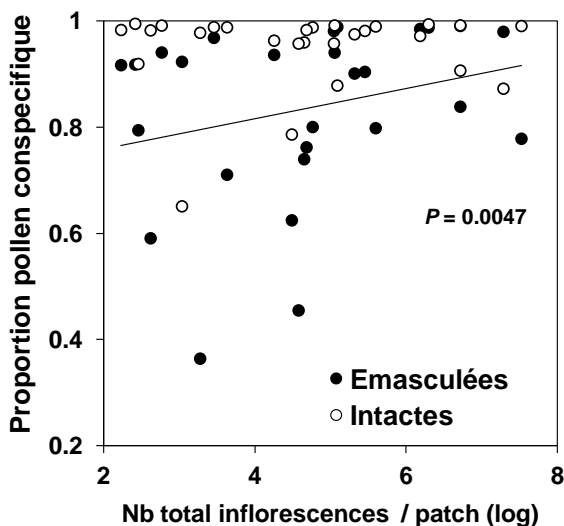


Figure 3. Effet de la quantité de ressource florale des patchs ($n = 28$) sur la proportion de pollen conspécifique déposé sur les stigmates de fleurs émasculées et intactes. La ligne (et la valeur de P) indique la régression significative existante uniquement pour les fleurs émasculées. Figure tirée du chapitre 2.

L'étude des charges polliniques stigmatiques a permis de confirmer l'hypothèse d'une **limitation en plantes conspécifiques dans les plus petits patchs** (Kunin, 1993). La quantité relative de pollen conspécifique (par rapport au pollen hétérospécifique) déposée sur les stigmates (fleurs émasculées recevant uniquement le pollen des pollinisateurs, figure 14) diminue significativement avec l'augmentation de la fragmentation locale des landes (chapitre 2). Ce résultat est conforme à l'augmentation du partage de pollinisateurs entre notre espèce cible et sa communauté environnante qui a été discutée plus haut pour les patchs les plus fragmentés. Deux autres études (Duncan *et al.*, 2004; Waites & Agren, 2004) ont, à ma connaissance, utilisées des expérimentations d'émasculature pour mettre en évidence l'effet de la taille et de la densité des populations sur le transfert de pollen (allopollen dans le cas de

ces études contrairement à notre espèce à floraison massive où de l'autopollen est apporté par geitonogamie). Ils ont trouvé des résultats similaires, soit une diminution de la proportion de pollen conspécifique déposée sur les stigmates accompagnant l'augmentation de l'isolement des plantes.

Le partage des pollinisateurs entre *R. ferrugineum* et sa communauté environnante dans les patchs les plus fragmentés peut entraîner une perte de pollen conspécifique sur des stigmates hétérosécifiques et, comme nous venons de le voir pour les fleurs émasculées, un transfert de pollen hétérosécifique plus important (Morales & Traveset, 2008). **Cependant, les coûts et les bénéfices d'un tel partage dépendront de la quantité et de la qualité du pollen reçu et du succès reproducteur des fleurs intactes ayant la capacité de s'autopolliniser.**

Que pouvons-nous apprendre des fleurs non émasculées ?

Les fleurs contrôles, c'est-à-dire pollinisées naturellement et pouvant donc réaliser de l'autopollinisation spontanée ou facilitée par le comportement des insectes, ont reçu une très faible quantité de pollen hétérosécifique (chapitre 2). Leurs charges polliniques stigmatiques ne sont affectées ni par le gradient de fragmentation locale (figure 14) ni par la densité de pollinisateurs. Les études ayant utilisé des fleurs intactes (non émasculées) n'ont le plus souvent trouvé aucun effet de la taille et de la densité des populations sur les charges polliniques conspécifiques déposées sur les stigmates (par exemple : Aizen, 1997; Molano-Flores & Hendrix, 1999; Caruso, 2002). Notre étude a permis de mettre en évidence que, contrairement aux fleurs émasculées, les charges polliniques stigmatiques des fleurs contrôles ne sont pas corrélées aux charges polliniques portées par l'ensemble des pollinisateurs (chapitre 2). Notamment, la proportion de pollen hétérosécifique est bien plus faible sur les stigmates des fleurs contrôles que sur le stigmate des fleurs émasculées. **L'autopollinisation semble jouer le rôle de barrière au pollen hétérosécifique.** Ce processus a été observé chez plusieurs espèces natives de Catalogne qui ne reçoivent que très peu de pollen provenant de l'espèce invasive *Carpobrotus affinis* en comparaison de la quantité de pollen de cette espèce transportée par les pollinisateurs (Bartomeus *et al.*, 2008). Les mécanismes sous-jacents sont peu connus et impliqueraient potentiellement une répartition différente du pollen des différentes espèces visitées sur le corps de l'insecte en fonction de la morphologie florale de chaque espèce (Armbruster *et al.*, 1994) ou une différence dans la phénologie des espèces (Bosch, 1992). Dans notre cas, étant donné que les fleurs émasculées reçoivent le pollen hétérosécifique dans une proportion correspondante à celle transportée par les

pollinisateurs, ces mécanismes ne seraient pas à l'origine du faible transfert de pollen hétérospécifique pour les fleurs intactes ; nous pouvons supposer que c'est bien l'autopollinisation qui en est responsable. L'autopollen pourrait monopoliser la surface stigmatique avant le dépôt de pollen par les pollinisateurs (espèce protandre) ou être en interaction chimique avec le pollen d'autres espèces bien que cela a été peu documenté (Heslop-Harrison, 2000; Brown & Mitchell, 2001). On peut également noter que d'une manière générale, la constance des pollinisateurs (*B. soroensis* par exemple, encadré 4) permettrait de prévenir le flux de pollen hétérospécifique et ses conséquences négatives sur le succès reproducteur des plantes (Grant, 1994; Gegear & Laverty, 2005).

2.2 L'assurance de reproduction : le rôle de l'autogamie facilitée

La limitation en transfert de pollen (plus communément appelée limitation en allopollen pour les espèces ne pouvant pas recevoir d'autopollen par geitonogamie) est une **pression de sélection déterminante pour l'évolution de l'autofécondation spontanée** qui permet d'assurer la reproduction lorsque les pollinisateurs et / ou les partenaires pour la reproduction sont réduits (Darwin, 1876; Lloyd, 1979). Cependant, la limitation en pollinisateurs et la limitation en partenaires pour la reproduction peuvent avoir des conséquences écologiques et évolutives différentes sur les systèmes de reproduction des plantes (Eckert *et al.*, 2010; Cheptou, 2011).

Nous avons trouvé que la quantité de pollen conspécifique présente sur les stigmates des fleurs contrôles est deux fois supérieure à celle présente sur les stigmates des fleurs émasculées (chapitre 2). Plus précisément, le nombre moyen de grains de pollen conspécifique présent sur le stigmate des fleurs contrôles atteint le nombre moyen d'ovules disponibles par ovaire (environ 500). **L'autopollinisation pourrait donc jouer un rôle clé dans l'assurance de reproduction selon le degré de dépression de consanguinité précoce de *R. ferrugineum*.**

Contrairement à ce qui avait été mis en évidence par Escaravage *et al.* en 1997, la capacité des individus de *R. ferrugineum* de notre site d'étude à réaliser l'autofécondation spontanée est modérée (chapitre 4). En moyenne, 41% des ovules sont fécondés lorsque les pollinisateurs n'interviennent pas dans la pollinisation (voir encadré 1). Chez *R. ferrugineum*, le stigmate est entouré des anthères des dix étamines. En général, les pores des cinq longues étamines se

trouvent au dessus du stigmate (et n'interviennent pas dans l'autopollinisation spontanée ; Escaravage *et al.*, 2001) et les pores des cinq petites se trouvent au niveau du stigmate ou au-dessous. L'herchogamie¹⁸ observée de 0,33 mm en moyenne (la taille des pièces fertiles étant de l'ordre de 5 à 7mm), pourrait contribuer à limiter l'autopollinisation spontanée (chapitre 4). Des études précédemment réalisées sur des populations de *Rhododendron ferrugineum* des Alpes n'ont montré aucune réduction de production de graines suite à une pollinisation par de l'autopollen (Escaravage *et al.*, 1997). Or, dans cette étude, **une dépression de consanguinité précoce** conduit à une production de graines de seulement 50 % lorsqu'on sature le stigmate en autopollen et l'index d'autocompatibilité (AC, encadré 1) de 70 % en moyenne (chapitre 5).

Alors que la PTL est identique le long du gradient de fragmentation locale, la production de graines est plus importante dans les patchs les plus fragmentés que dans les patchs où la ressource florale de *R. ferrugineum* n'est pas limitante. Autrement dit, la limitation en pollen total (PL, encadré 1), qui prend en compte la part de graines produite par autogamie, diminue avec la fragmentation locale des patchs (chapitre 4). Ce résultat confirme l'absence d'effet Allee chez cette espèce à floraison massive et suggère un rôle clé de l'autogamie dans la compensation de la PTL dans les patchs les plus fragmentés. Un résultat important de notre étude est que **l'autogamie facilitée** par le comportement des pollinisateurs **semble responsable de l'augmentation du succès reproducteur dans les patchs les plus fragmentés** pour lesquels nous avons observé une augmentation du taux de visites (chapitre 4). *Rhododendron ferrugineum* possède des anthères à déhiscence poricide où la libération du pollen est facilitée par des vibrations réalisées par certains pollinisateurs (Buchmann, 1983; Knudsen & Olesen, 1993). *Bombus soroensis*, notamment, réalise ce type de pollinisation (« buzz pollination »).

L'assurance de reproduction (RA, encadré 1), qui mesure la compensation potentielle du succès reproducteur par l'autogamie, est généralement présentée dans la littérature comme un estimateur de la capacité à se reproduire sans l'intervention d'un pollinisateur (Lloyd, 1992). Cependant, nous montrons ici que **l'autogamie facilitée, comprise dans la mesure de RA, augmente le succès reproducteur des plantes lorsque c'est la disponibilité en partenaires pour la reproduction qui limite la pollinisation et non pas celle des pollinisateurs** (Lloyd & Schoen, 1992; Vaughton & Ramsey, 2010). De plus, encore peu d'études ont démontré la

¹⁸ L'herchogamie a été mesuré par la distance de l'étamine la plus proche parmi les étamines se trouvant au-dessus du stigmate et pouvant donc jouer un rôle dans l'autopollinisation spontanée.

compensation de la limitation en pollen par RA, bien que le concept soit établi de façon théorique dans la littérature (Eckert *et al.*, 2006; Eckert *et al.*, 2010).

En résumé, la limitation en pollinisateurs dans les plus grands patchs et la limitation en partenaires pour la reproduction dans les patchs les plus fragmentés ont des conséquences écologiques différentes :

- (i) la **limitation en pollinisateurs** conduit à une **réduction du succès reproducteur** (limitation en pollen total). Cette **limitation en pollen n'est pas compensée par l'assurance de reproduction** car la capacité d'autopollinisation spontanée ne permet pas de féconder 100 % des ovules disponibles et le faible taux de visites ne permet une contribution suffisante de l'autogamie facilitée;
- (ii) la **limitation en partenaires pour la reproduction** conduit à un **faible transfert de pollen conspécifique** qui est compensé par de **l'autogamie facilitée** par les pollinisateurs assurant la reproduction (augmentation du succès reproducteur et diminution de la limitation en pollen). La capacité d'autopollinisation spontanée ne permet pas, dans ce cas non plus, de compenser à elle seule la limitation en pollen. Cependant, le transfert de pollen hétérosppécifique, dont la proportion transportée par les pollinisateurs augmente lorsque l'abondance des plantes conspécifiques est réduite, semble limité par l'autopollinisation.

Grâce à cette approche intégrative de l'étude de la pollinisation, nous avons pu expliquer l'importance relative de chaque variable (cortège de pollinisateurs, taux de visites, charges polliniques et paramètres de pollinisation) dans la pollinisation de *R. ferrugineum* le long d'un gradient de fragmentation locale des patchs de lande. Cependant, afin d'évaluer les conséquences évolutives du gradient de fragmentation locale sur *R. ferrugineum*, il est nécessaire de s'intéresser au système de reproduction réalisé (taux d'autofécondation). Or, ce dernier ne peut être induit des charges polliniques ou des paramètres de pollinisation. La valeur sélective des descendants issus d'autofécondation doit être évaluée par rapport à celle des descendants issus d'allofécondation afin de pouvoir comprendre les conséquences d'une limitation de la pollinisation sur la survie des populations.

2.3 Variation des taux d'autofécondation : contexte écologique versus traits floraux

Le développement par pyroséquençage de neuf marqueurs microsatellites polymorphes (chapitre 3) et la mise au point de trois marqueurs déjà existant dans la littérature chez des éricacées (Naito *et al.*, 1998; Dendauw *et al.*, 2001) ont permis l'estimation du système de reproduction réalisé de *R. ferrugineum* à l'échelle multilocus (Ritland, 2002). Ce dernier peut être décrit à partir d'un modèle de reproduction mixte dans lequel une partie des descendants sont issus d'autofécondation et ceux qu'il reste d'événements aléatoires de fécondation croisée (Ritland, 1990b). L'approche multilocus permet une estimation du taux d'autofécondation plus fine que l'approche simple locus et non biaisée (Ritland & Jain, 1981), notamment grâce à la différenciation de l'autofécondation et des événements de fécondation croisée entre individus apparentés.

R. ferrugineum produit en moyenne 51 % de ses descendants par allofécondation (système de reproduction mixte Goodwillie *et al.*, 2005). Le taux d'allofécondation multilocus (t_m) varie de 0.163 ± 0.069 à 0.791 ± 0.294 par patch (chapitres 4 et 5). Des valeurs de t_m plus élevées ont été documentées chez d'autres espèces d'éricacées (comprises entre 0.71 et 0.89 chez *R. aureum*, Hirao *et al.*, 2006 ; et entre 0.71 et 0.90 chez *Calluna vulgaris*, Mahy & Jacquemart, 1998).

La fragmentation locale des patches de lande à rhododendron a pour conséquence de réduire le taux d'allofécondation de *R. ferrugineum* (figure 15). Un effet négatif de la réduction de la taille et de la densité des populations sur le taux d'allofécondation a déjà été documenté chez plusieurs espèces avec, à l'origine de cette variation, des causes écologiques (Karron *et al.*, 1995; Franceschinelli & Bawa, 1999; Routley *et al.*, 1999) ou génétiques (évolution des traits floraux ; Moeller & Geber, 2005).

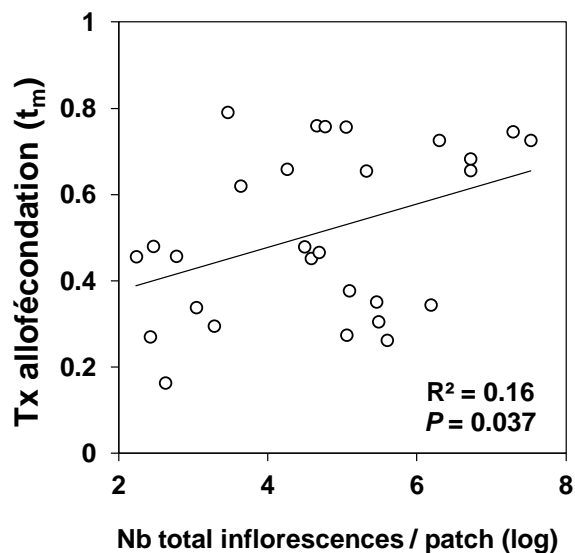


Figure 4. Relation entre les ressources florales de *R. ferrugineum* au sein des patchs et le taux multilocus d'allofécondation (t_m). Cent six familles dont 1001 descendants ont été génotypés à l'aide de 12 marqueurs microsatellites. Figure tirée des chapitres 4 et 5.

L'absence de variabilité de la taille des fleurs (longueur et largeur), de l'herchogamie, de l'autofécondité et de l'autocompatibilité le long du gradient de fragmentation locale confirme que **le taux d'autofécondation plus élevé que l'on trouve dans les patchs les plus petits n'est pas dû à une évolution des traits floraux facilitant l'autofécondation**. Par exemple, une réduction de la taille des fleurs et de leur quantité, une réduction de l'herchogamie et une autofécondité et une autocompatibilité complètes auraient pu être responsables de l'augmentation du taux d'autofécondation (Barrett, 2003; Moeller & Geber, 2005). Le **contexte de pollinisation** dans les patchs les plus fragmentés (moins de partenaires pour la reproduction et autogamie facilitée) semble donc responsable de l'augmentation du taux d'autofécondation dans cette extrémité du gradient. Conformément à notre étude, au sein du genre *Vaccinium* (Ericaceae), l'autogamie facilitée est responsable de la majorité des graines produites par autofécondation, contrairement à l'autogamie spontanée qui reste un mécanisme rare (Jacquemart & Thompson, 1996).

Quels facteurs pourraient expliquer que la limitation de la pollinisation (pollinisateurs *versus* partenaires pour la reproduction) n'aie pas conduit à une augmentation de la capacité à réaliser l'autogamie spontanée (évolution de l'autofécondation) ?

Tout d'abord, les patrons de reproduction (taux d'allofécondation) peuvent refléter un changement de conditions écologiques récent n'ayant pas entraîné de changement évolutif du système de reproduction. En effet, l'espèce cible a une durée de vie longue (probablement à l'échelle séculaire) et le renouvellement des générations est probablement très lent. Le niveau de "fragmentation" du milieu entraînant une limitation de la pollinisation pourrait ne pas avoir

affecté suffisamment de générations d'arbustes pour avoir des conséquences évolutives sur le système de reproduction.

Par ailleurs, nous pouvons néanmoins discuter des différentes explications possibles au maintien de phénotypes "plutôt allogames". Dans les plus grands patches, la limitation en pollinisateurs semble due à une compétition intraspécifique pour le service de pollinisation et la limitation en transfert de pollen reste modérée (30 %, chapitre 1). D'après ces résultats, nous faisons l'hypothèse que les pressions de sélection engendrées par la limitation en pollinisateurs conduisent au maintien de traits floraux permettant de maximiser l'attraction des insectes. En effet, nous avons observé, en plus de la production massive de fleurs, une capacité à réaliser l'autofécondation spontanée modérée et une herchogamie (> 0) qui ne permettrait pas un contact direct entre le stigmate et la plus proche étamine. **Ces traits, de « type allogame », permettraient d'assurer une descendance par allofécondation, malgré un succès reproducteur réduit** (Eckert *et al.*, 2010). Dans le cas d'une forte dépression de consanguinité, il serait plus avantageux pour les individus de produire moins de graines issues de fécondation croisée que plus de graines issues d'autofécondation, ces dernières ayant une valeur sélective très faible.

Dans les plus petits patches, la limitation en partenaires pour la reproduction est compensée par l'autogamie facilitée et probablement par de la geitonogamie (chapitre 4). Ces deux types de pollinisation nécessitant l'intervention d'un vecteur de pollen, elles pourraient conduire à maintenir les traits fortement impliqués dans l'attractivité des pollinisateurs. L'évolution de l'autofécondation spontanée peut donc ne pas avoir lieu, au profit de traits permettant de maximiser l'attractivité des pollinisateurs (Emms *et al.*, 1997; Barrett, 2002). Ainsi, des phénotypes floraux de type « allogames » (van Kleunen & Ritland, 2004) seraient maintenus malgré la réduction de l'abondance des plantes conspécifiques. **Par conséquent, l'absence de différence significative entre les traits floraux des grands et des petits patches pourrait être due à des pressions de sélection différentes mais conduisant à des phénotypes similaires.**

Les espèces à floraison massive (dont font partie un grand nombre d'éricacées) sont connues pour produire une grande proportion de graines par geitonogamie (Eckert, 2000). La croissance clonale peut également augmenter le nombre de fleurs disponibles sur un même genet et influencer le taux d'autofécondation par le biais du comportement des pollinisateurs, qui visitent successivement un grand nombre de fleurs (par exemple chez *Vaccinium*

myrtillus, Ericaceae, Albert *et al.*, 2008). *Rhododendron ferrugineum* est une espèce clonale mais ce mode de propagation est limité sur notre site d'étude où les individus sont bien individualisables (sur plus de 500 individus génotypés, seuls 6 clones ont été détectés et exclus de l'analyse).

Bien que nous n'ayons pas différencié la geitonogamie de l'autogamie, il est fort probable qu'une grande partie de l'autofécondation observée soit due à un transfert de pollen entre fleurs d'un même individu. La geitonogamie ainsi que l'autogamie peuvent être à l'origine d'une forte perte de gamètes (« *seed discounting* » et/ou « *pollen discounting* ») lorsque l'autofécondation se fait au dépend de l'allofécondation (Nagylaki, 1976; Holsinger *et al.*, 1984; Llyod, 1992). Lorsque la pollinisation est limitante (pollen déposé exclusivement par les pollinisateurs : limitation en transfert de pollen), la perte de gamètes est supposée minimale (Llyod, 1992; Goodwillie *et al.*, 2005; Eckert *et al.*, 2010). Dans notre cas d'étude, la limitation en pollinisateurs et en partenaires pour la reproduction conduit à un dépôt de pollen insuffisant, mais cette limitation reste modérée (30%). Nous pouvons donc envisager la possibilité que l'autofécondation réduise le taux d'allofécondation. Pour mesurer précisément la perte de graines, il faut donc pouvoir estimer la diminution de l'allofécondation provoquée par l'augmentation de l'autofécondation (assurance de reproduction). Autrement dit, il nous faudrait connaître la production de graines par allogamie des fleurs émasculées (taux d'allofécondation). Or, dans notre étude, nous n'avons ni dissocié la production relative de graines par allogamie de la geitonogamie, ni estimé le taux d'autofécondation des fleurs émasculées (Schoen & Lloyd, 1992; Herlihy & Eckert, 2002). Nous ne pouvons donc pas estimer précisément le taux de perte de graines.

2.4 Quelle valeur adaptative pour l'autofécondation ?

Les réponses évolutives du système de reproduction aux variations du contexte écologique dépendent de la valeur adaptative de l'autofécondation par rapport à celle de l'allofécondation. La dépression de consanguinité, diminuant la valeur sélective des descendants issus d'autofécondation, peut s'exprimer à différents stades au cours du cycle de vie des organismes (Charlesworth & Charlesworth, 1987). Afin d'appréhender la contribution des descendants issus d'autofécondation à la population efficace (plantes matures), nous avons mesuré la dépression de consanguinité en population naturelle sur la base de données

génétiques (Ritland, 1990a). Pour cela, nous avons mis en relation le taux d'autofécondation réalisé ($1 - t_m$) et la consanguinité des individus matures à l'échelle de chaque patch (figure 16). **Nous avons ainsi mis en évidence une forte dépression de consanguinité moyenne de 0,9** (chapitre 5).

La consanguinité au sein des individus matures est très faible ($-0,15 < F_{is} < 0,38$) et significativement différente de zéro dans seulement 4 patchs sur 28. L'autofécondation, qui dans notre cas est une conséquence du contexte de pollinisation, a donc **une faible valeur adaptative ne permettant probablement pas l'évolution des traits spécifiques de l'autofécondation** (l'avantage automatique de l'autofécondation est largement contrebalancé par la dépression de consanguinité). En effet, en présence de la limitation en transfert de pollen observée (30 %), le seuil théorique permettant l'évolution de l'autofécondation dans les populations correspondrait à une dépression de consanguinité de 0,85 ($ID < 1 - e/2$, e étant la proportion d'ovules non fécondés du fait de la limitation de la pollinisation ; (Lloyd & Schoen, 1992).

De plus, la forte valeur de dépression de consanguinité confirme que l'augmentation du succès reproducteur par autogamie dans les plus petits patchs serait particulièrement coûteuse si celle-ci se fait au dépend de l'allogécondation (perte de graines) (Herlihy & Eckert, 2002). La dépression de consanguinité précoce mise en évidence (autocompatibilité partielle et réduction de la production de fruits viables dans les plus petits patchs) peut être maintenue par sélection, puisqu'elle permet de limiter l'autogamie.

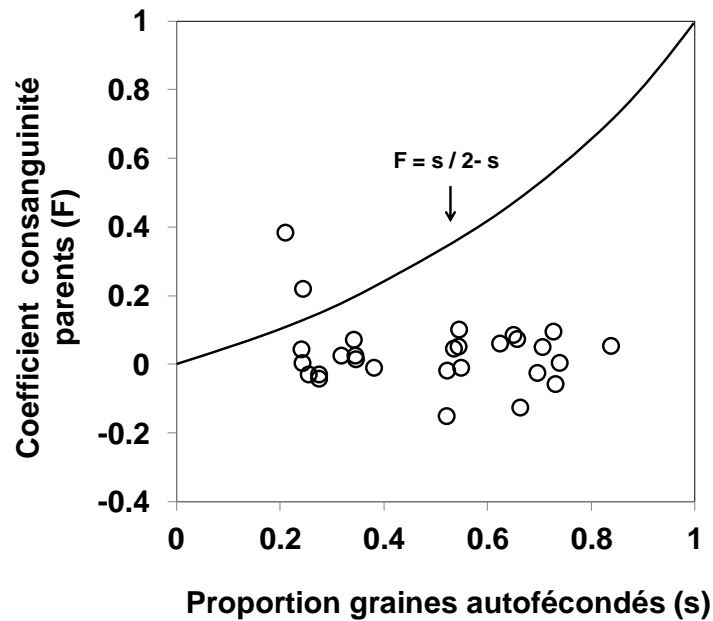


Figure 16. Relation entre la proportion de graines autofécondées s , et le coefficient de consanguinité des individus matures F , au sein de chaque patch.

La ligne correspond à la relation entre s et F à l'équilibre ($ID = 0$). Figure tirée du chapitre 5.

Chez *R. ferrugineum*, la floraison massive et la déhiscence poricide des anthères permettent d'assurer respectivement l'attractivité des pollinisateurs et une libération de pollen efficace mais ont pour conséquences d'augmenter la géitonogamie et l'autogamie facilitée. Une forte dépression de consanguinité à l'échelle du cycle de vie permet de maintenir une diversité génétique importante au sein des patches (éviter le coût de l'autofécondation soit une perte de diversité génétique) tout en conservant les bénéfices d'une forte attractivité des pollinisateurs. Les causes d'une forte dépression de consanguinité chez les espèces pérennes et le maintien d'un système de reproduction mixte malgré cette dernière sont discutées dans le chapitre 5.

L'**augmentation de la production de graines par autofécondation** dans les plus petits patches, qui permet de compenser la limitation en transfert de pollen (RA), est donc fortement **contrebalancée par la dépression de consanguinité** observée. La diminution de l'avantage procuré par la RA est de l'ordre de 90%. Par conséquent, il apparaît primordial de mesurer la dépression de consanguinité (en population naturelle et à l'échelle du cycle de vie) de concert avec l'estimation de la RA. La dépression de consanguinité est assez importante pour maintenir la faible taille et la faible densité des plus petits patches de *R. ferrugineum* et pourrait à terme les entrainer vers l'extinction (Ellstrand & Elam, 1993).

3. LE RÔLE DES CARACTÉRISTIQUES DE LA COMMUNAUTÉ ENVIRONNANTE DANS LES INTERACTIONS PLANTES-POLLINISATEURS

Dans la première partie de cette discussion, nous avons établi l'existence d'un partage de pollinisateurs entre *R. ferrugineum* et sa communauté environnante. Dans la seconde partie, nous avons vu que la communauté environnante pourrait permettre de maintenir les insectes pollinisateurs de *R. ferrugineum* dans les patchs les plus fragmentés étant donné que ceux-ci transportent une proportion plus importante de pollen hétérospécifique lorsqu'ils sont collectés dans cette partie du gradient. Cependant, le pollen hétérospécifique n'est déposé qu'en très faible quantité dans les fleurs pollinisées naturellement, ce qui minimise la compétition interspécifique (flux de pollen hétérospécifique). Les propriétés de la communauté environnante (densité florale, richesse spécifique et relations phylogénétiques) peuvent jouer un rôle clé dans les interactions plantes-pollinisateurs (Geber & Moeller, 2006).

3.1 La richesse spécifique et la densité florale de la communauté environnante

Tout d'abord, le nombre total d'espèces cofleurissantes (richesse spécifique) avec *R. ferrugineum* ne varie pas le long du gradient de fragmentation locale. Cependant, il existe une relation négative entre la densité florale¹⁹ de la communauté environnante et la quantité de ressources florales de rhododendron au sein de chaque lande (annexe 1). Cette **forte densité florale** pourrait permettre de **compenser la réduction de l'abondance de *R. ferrugineum*** dans les patchs les plus fragmentés et de fournir suffisamment de ressources pour maintenir les pollinisateurs visitant *R. ferrugineum* (effet « source » de la communauté environnante).

Ni la richesse spécifique, ni la densité florale de la communauté environnante n'ont d'effet sur le cortège de pollinisateurs, et ce, pour les deux années d'étude (abondance, densité et diversité des visiteurs de *R. ferrugineum* et de la communauté environnante, $P > 0,05$ pour

¹⁹ La densité florale de la communauté environnante est le nombre de fleurs épanouies, toutes espèces confondues par m².

tous les tests réalisés²⁰). Seules les ressources florales de *R. ferrugineum*, comme cela a été présenté dans la première partie de cette discussion, ont un effet sur l'abondance, la densité et la diversité des visiteurs des fleurs des landes à rhododendron. Cependant, **la richesse spécifique de la communauté environnante²¹ a un effet positif sur la proportion de pollen conspécifique** (rhododendron) portée par chaque insecte visitant *R. ferrugineum* et la communauté environnante (*Bombus spp.*, $P < 0,0001$) et déposée sur les stigmates des fleurs émasculées ($P = 0,04$). En ce qui concerne la quantité absolue de pollen, seule la quantité de pollen de rhododendron présente dans les charges polliniques des pollinisateurs est positivement affectée par la richesse spécifique de la communauté environnante (pollinisateurs visitant le rhododendron, $P = 0,016$ et la communauté environnante, $P = 0,002$).

La relation positive entre la richesse spécifique de la communauté environnante et la proportion de pollen de rhododendron dans les charges polliniques pourrait être due à un maintien des visites réalisées par le pollinisateur le plus constant (*Bombus soroeensis*) dans les zones où la richesse spécifique de la communauté environnante est la plus importante. Ainsi, les pollinisateurs au comportement le moins constant envers *R. ferrugineum* pourraient visiter moins fréquemment cette espèce au profit de la communauté environnante lorsque la richesse spécifique de celle-ci est importante. La communauté environnante pourrait donc avoir un effet positif (facilitation) sur la pollinisation et la reproduction sexuée de *R. ferrugineum* en diminuant le taux de visites des espèces les moins constantes envers le rhododendron. Cependant, étant donné que le flux de pollen hétérosppécifique est très faible pour les fleurs pouvant s'autopolliniser (fleurs intactes, chapitre 2), il est peu probable que la reproduction sexuée de *R. ferrugineum* bénéficie d'une réduction de visites des pollinisateurs non constants. Nous n'avons d'ailleurs trouvé aucun effet significatif de la richesse spécifique ou de la densité florale de la communauté environnante sur la pollinisation et le système de reproduction de *R. ferrugineum*. Toutefois, l'étude des charges polliniques a été effectuée en 2010 et celle de la pollinisation et du système de reproduction en 2009, ce qui ne nous permet pas de conclure de façon certaine.

²⁰ Régressions multiples incluant les ressources florales totales de *R. ferrugineum* et la densité florale et la richesse spécifique de la communauté environnante par patch. La colinéarité des variables n'a pas d'influence sur la variance du test statistique (test de l'inflation de la variance, VIF).

²¹ L'étude des charges polliniques ayant été effectuée en 2010, nous utilisons ici les caractéristiques de la communauté environnante estimée cette année là.

3.2 Les relations phylogénétiques au sein des landes à *R. ferrugineum*

Les relations phylogénétiques entre les plantes entomogames de la communauté environnante et *R. ferrugineum* varient le long du gradient de fragmentation locale (annexe 1). En effet, nous avons montré **que plus *R. ferrugineum* est abondant dans le patch de lande, plus les espèces cofleurissantes sont proches phylogénétiquement de cette espèce cible** (réduction de MPDF : « *mean phylogenetic distance from the focal species* »). Dans les patches où *R. ferrugineum* est abondant, les espèces cofleurissantes sont donc plus proches de celui-ci mais produisent moins de fleurs par m² (densité florale réduite, voir ci-dessus). **La composition de la communauté environnante (espèces entomogames) serait donc influencée par l'abondance de *R. ferrugineum*.** À ma connaissance, aucune étude n'a montré l'effet d'une espèce dominante sur les liens phylogénétiques des espèces de la communauté environnante.

Étant donné que l'altitude (1550 m à 1750 m), la pente (environ 35 %) et l'exposition (nord-nord-ouest) sont très peu variables le long du gradient de fragmentation locale, il est peu probable que les variations du cortège d'espèces cofleurissantes avec *R. ferrugineum* soient dues à des variations pédologiques ou microclimatiques.

Un des objectifs de cette étude était de déterminer l'effet des caractéristiques de la communauté environnante sur la pollinisation et la reproduction sexuée de *R. ferrugineum*. À cette occasion, **le résultat obtenu nous indique l'éventualité d'un effet, à l'inverse, de cette espèce à floraison massive sur les plantes cofleurissantes.**

En théorie, la compétition (pour la pollinisation entre autres) devrait conduire au maintien d'espèces phylogénétiquement distantes dans le but d'éviter une trop forte compétition (Armbruster, 1995). Cependant, il peut être avantageux pour une espèce d'être phylogénétiquement plus proche d'une espèce qui à elle seule, surpasse les capacités d'attraction du reste de la communauté (« *magnet species* »), afin de recevoir des visites (Moeller, 2004; Moeller & Geber, 2005). La proximité phylogénétique entre *R. ferrugineum* et sa communauté environnante dans les plus grands patches pourrait permettre aux plantes de la communauté environnante d'avoir plus de chance d'être visitée. En effet, les plantes proches phylogénétiquement devraient partager un grand nombre de caractères communs (Webb *et al.*, 2002) et pouvoir être pollinisées par les mêmes pollinisateurs (Sargent & Ackerly, 2008).

En effet, nos résultats indiquent que les hyménoptères visitent un nombre croissant d'espèces cofleurissantes²² avec *R. ferrugineum* avec l'augmentation de la taille des landes (augmentation de l'abondance du rhododendron, plantes cofleurissantes plus proches phylogénétiquement du rhododendron, densité florale plus faible). De plus, les pollinisateurs récoltés dans la communauté environnante (annexe 1) portent une très faible proportion de pollen de rhododendron (< 5 %), sauf dans les plus grands patchs (environ 34 %). Ce résultat pourrait indiquer que **les pollinisateurs de la communauté environnante visitent plus fréquemment le rhododendron dans les plus grands patchs où les espèces de la communauté environnante sont phylogénétiquement plus proches du rhododendron.**

La forte corrélation entre le gradient de fragmentation locale et MPDF ne nous permet pas de tester l'effet de cette dernière variable sur la pollinisation et le système de reproduction de *R. ferrugineum*. Sargent *et al.* (2011) ont montré une réduction de la limitation en pollen lorsque la distance phylogénétique entre l'espèce cible *Lasthenia fremontii* et sa communauté environnante diminue. Leurs résultats confirment le rôle déterminant que peuvent jouer les relations phylogénétiques dans l'assemblage des communautés par le biais des interactions plantes-pollinisateurs (Sargent & Ackerly, 2008). Nous sommes actuellement en train d'étudier le rôle de la diversité phylogénétique (indice de Faith, annexe 1) et de la proximité phylogénétique entre les espèces de la communauté environnante (« *nearest taxon index* », annexe 1) dans les interactions plantes-pollinisateurs, la pollinisation et la reproduction sexuée de *R. ferrugineum*.

²² Données tirées des transects d'observation réalisés au sein de chaque patch (méthode décrite dans les chapitres 1 et 2) pour lesquels nous avons relevé l'identité de chaque plante visitée.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les causes et les conséquences de la limitation de la pollinisation chez une espèce à floraison massive ont été étudiées au moyen d'une approche comprenant : la description des interactions plantes-pollinisateurs à l'échelle de la communauté, l'étude de la quantité et de la qualité du pollen transporté et déposé par les pollinisateurs et l'étude de la reproduction sexuée (pollinisation et système de reproduction) de l'espèce cible. Les résultats obtenus suggèrent que les espèces à floraison massive possèdent des caractéristiques leur permettant de faire face aux modifications des conditions écologiques telles que la fragmentation des populations de plantes et le déclin des pollinisateurs, tout en maintenant leur diversité génétique. La présence d'une communauté environnante riche en plantes entomogames s'est avérée être un facteur clé pour le maintien de la pollinisation en habitat fragmenté.

Contrairement à ce qui a été observé dans la littérature pour des espèces annuelles ne présentant pas de production massive de fleurs, nos résultats suggèrent que la réduction de la disponibilité en plantes conspécifiques, chez les espèces à floraison massive, serait compensée par une augmentation du nombre de visites par fleur. Le partage des pollinisateurs avec la communauté environnante et la forte attractivité des espèces à floraison massive permettent à ces dernières d'attirer et de monopoliser les pollinisateurs de la communauté, ce qui leur permet de compenser l'effet négatif de l'isolement des individus sur l'abondance des pollinisateurs. **Leur pollinisation serait limitée par la disponibilité en pollinisateurs lorsque les ressources florales sont abondantes et par la disponibilité en partenaires lorsqu'elles sont réduites.**

Tout au long de ce travail, nous nous sommes attachés à distinguer les conséquences d'une limitation en pollinisateurs et d'une limitation en partenaires sexuels sur la pollinisation et reproduction sexuée d'une espèce autocompatible. En dépit de preuves croissantes de l'effet négatif des changements globaux sur la pollinisation, les réponses évolutives des systèmes de reproduction à ces deux types de limitation ont été peu étudiées (Eckert *et al.*, 2010). Nous avons trouvé que la limitation en pollinisateurs et celle en partenaires conduisent toutes deux à **un transfert de pollen limitant pour la reproduction (les ovules disponibles n'ont jamais été fécondés en totalité lorsqu'on exclut l'autopollinisation)**. En théorie, la limitation en transfert de pollen (plus précisément en allopollen) conduit à une évolution de l'autofécondation (spontanée), celle-ci permettant d'assurer la reproduction lorsque les

pollinisateurs ou les partenaires sont rares (Darwin, 1876; Jain, 1976). Dans notre étude, **aucune évolution de l'autofécondation spontanée n'a été observée en réponse à la limitation de la pollinisation**. On peut émettre l'hypothèse que le degré de limitation en transfert de pollen observé n'est pas identique chaque année, ce qui diminuerait la force des pressions de sélection sur le système de reproduction. Cependant, étant donné la stabilité de la quantité de ressources florales de *R. ferrugineum* (espèce pérenne à croissance très lente), une telle fluctuation ne pourrait être due qu'à une variation de la disponibilité en pollinisateurs. De plus, les données de production de graines obtenues en 2009 et celles des charges polliniques obtenues en 2010 donnent des résultats identiques, ce qui démontre que le dépôt de pollen par les pollinisateurs est insuffisant pour féconder la totalité des ovules disponibles sur les deux années étudiées.

Quel que soit le contexte de pollinisation des patchs de lande (disponibilité en plantes et en pollinisateurs), **une dépression de consanguinité précoce** conduit à une faible production de graines par autofécondation chez *R. ferrugineum*. Notre étude a permis de mettre en évidence que la limitation en pollinisateurs et la limitation en partenaires conduisent à des modes de pollinisation (respectivement allogamie / autogamie facilitée), un succès reproducteur (faible / élevé) et un taux d'autofécondation (faible / élevé) contrastés. Néanmoins, la forte dépression de consanguinité observée permet le maintien d'une diversité génétique importante et similaire tout le long du gradient de fragmentation locale des patchs de lande. Un tel niveau de dépression de consanguinité en population naturelle, cohérent avec les niveaux mis en évidence chez d'autres espèces pérennes, ne permet pas l'évolution de l'autofécondation et maintient ainsi un système de reproduction mixte. Nos résultats suggèrent par conséquent que l'évolution du système de reproduction des arbustes à floraison massive serait conditionnée par **de fortes pressions de sélection liées à l'attraction des pollinisateurs**. En effet, le système de reproduction de ces espèces serait dépendant de la balance entre les coûts (autofécondation par autogamie facilitée et geitonogamie) et les bénéfices (attraction et monopolisation des pollinisateurs) d'une production massive de fleurs.

La phénologie de la floraison détermine le nombre de partenaires potentiels pour la reproduction et peut influencer les patrons de flux de gènes entre et au sein des populations (Rathcke, 1983; Bronstein *et al.*, 1990). Une synchronisation importante de la floraison, caractéristique des espèces à floraison massive, induirait une variabilité génétique importante entre et au sein des populations, de faibles niveaux d'isolement génétique entre populations proches et une structuration génétique au sein des populations (Dominguez *et al.*, 2005). Nos

résultats confirmeraient ces tendances puisque nous avons observé une diversité génétique importante ainsi qu'une « sous-structure » génétique (*biparental inbreeding*) au sein des patchs de lande à rhododendron. L'étude de la différenciation génétique entre patchs en prenant en compte l'isolement par la distance, nous permettrait de pouvoir appréhender les conséquences du gradient de fragmentation locale sur les flux de gènes au sein de cet habitat fragmenté.

Il serait intéressant de quantifier le taux de perte de graines (« *seed discounting* ») le long du gradient de fragmentation locale afin de pouvoir estimer si l'autofécondation se fait au dépend de l'allofécondation lorsque la limitation en transfert de pollen est modérée. Pour cela, il serait nécessaire d'obtenir le taux d'autofécondation par geitonogamie de fleurs émasculées afin de comparer la production de graines et le taux d'autofécondation de fleurs ayant la capacité, ou non, de s'autopolliniser (Schoen & Lloyd, 1992).

De par la forte attractivité de *R. ferrugineum* et du fait qu'elle monopolise les pollinisateurs de la communauté, **cette espèce à floraison massive devrait avoir un impact important sur la pollinisation et la reproduction des espèces cofleurissantes**. Cet impact pourrait être positif si cette espèce permet d'augmenter les visites dans la communauté environnante (« *magnet species* ») sans induire un flux de pollen hétérospécifique trop important. Dans ce cas, nous nous attendrions à ce que les espèces capables de partager leurs pollinisateurs avec *R. ferrugineum* soient favorisées. Ceci serait d'autant plus probable pour les espèces phylogénétiquement proches de notre espèce cible (« *clustering* » phylogénétique). Cet impact pourrait par contre être négatif si la monopolisation de pollinisateurs par le rhododendron entraîne la diminution des visites aux espèces cofleurissantes. Dans ce cas, les espèces les plus proches phylogénétiquement du rhododendron (partageant probablement les mêmes pollinisateurs) seraient défavorisées et la structuration phylogénétique de la communauté environnante serait surdispersée (« *evenness* »). Il serait donc particulièrement intéressant d'étudier la limitation en pollen et les charges polliniques stigmatiques des espèces de la communauté environnante le long du gradient de fragmentation locale ainsi que la répartition des traits floraux de la communauté (couleurs et odeurs florales, forme des fleurs, quantité/qualité de nectar) en fonction de l'abondance du rhododendron.

Cette étude a clairement démontré l'intérêt de considérer le système écologique dans son ensemble (des interactions à l'échelle de la communauté aux propriétés intrinsèques de l'espèce cible) lorsque l'on s'intéresse aux conséquences écologiques et évolutives des

changements globaux sur la reproduction sexuée des plantes affectées. Afin de confirmer le rôle de la communauté environnante dans les interactions plantes-pollinisateurs des landes à rhododendron, une approche similaire (comprenant différents degrés de fragmentation de landes) pourrait être menée dans des landes ayant une communauté environnante « pauvre », c'est-à-dire de très faible densité et richesse spécifique en plantes entomogames, quelle que soit l'abondance du rhododendron.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguilar, R., Ashworth, L., Galetto, L. & Aizen, M. A. (2006) Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters*, **9**, 968-980.
- Aizen, M. A. (1997) Influence of local floral density and sex ratio on pollen receipt and seed output: empirical and experimental results in dichogamous *Alstroemeria aurea* (Alstroemeriaceae). *Oecologia*, **111**, 404-412.
- Aizen, M. A., Ashworth, L. & Galetto, L. (2002) Reproductive success in fragmented habitats: do compatibility systems and pollination specialization matter? *Journal of Vegetation Science*, **13**, 885-892.
- Aizen, M. A. & Feinsinger, P. (1994) Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco dry forest, Argentina. *Ecology*, **75**, 330-351.
- Aizen, M. A. & Feinsinger, P. (2003) Bees not to be? Responses of insect pollinator faunas and flower pollination to habitat fragmentation. *How landscapes change* (eds G. A. Bradshaw & P. A. Marquet), pp. 111-129. Springer-Verlag Berlin, Germany.
- Aizen, M. A. & Harder, L. D. (2007) Expanding the limits of the pollen-limitation concept: Effects of pollen quantity and quality. *Ecology*, **88**, 271-281.
- Albert, T., Raspe, O. & Jacquemart, A. L. (2008) Influence of clonal growth on selfing rate in *Vaccinium myrtillus* L. *Plant Biology*, **10**, 643-649.
- Anderson, B., Midgley, J. J. & Stewart, B. A. (2003) Facilitated selfing offers reproductive assurance: A mutualism between a hemipteran and carnivorous plant. *American Journal of Botany*, **90**, 1009-1015.
- Antonovi, J. (1968) Evolution in closely adjacent plant populations. V. Evolution of self-fertility. *Heredity*, **23**, 219-&.
- Armbruster, W. S. (1995) The origins and detection of plant community structure: Reproductive versus vegetative processes. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, **30**, 483-497.
- Armbruster, W. S., Edwards, M. E. & Debevec, E. M. (1994) Floral character displacement generates assemblage structure of Western Australian triggerplants (*Stylidium*). *Ecology*, **75**, 315-329.
- Arroyo, M. T. K., Armesto, J. J. & Primack, R. B. (1985) Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of central Chile II. Effect of temperature on visitation rates and pollination possibilities. *Plant Systematic and Evolution*, **149**, 187-203.
- Ashman, T. L., Knight, T. M., Steets, J. A., Amarasekare, P., Burd, M., Campbell, D. R., Dudash, M. R., Johnston, M. O., Mazer, S. J., Mitchell, R. J., Morgan, M. T. & Wilson, W. G. (2004) Pollen limitation of plant reproduction: Ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, **85**, 2408-2421.
- Baker, H. G. (1955) Self-compatibility and establishment after 'long distance' dispersal. *Evolution*, **9**.
- Baker, H. G. (1959) Reproductive methods as factors in speciation in flowering plants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **24**, 177-191.
- Baker, H. G. (1967) Support for Baker's law as a rule. *Evolution*, **21**, 853-856.
- Barrett, S. C. H. (2002) The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 274-284.
- Barrett, S. C. H. (2003) Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **358**, 991-1004.
- Barrett, S. C. H. (2010a) Darwin's legacy: the forms, function and sexual diversity of flowers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **365**, 351-368.

- Barrett, S. C. H. (2010b) Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **365**, 99-109.
- Barrett, S. C. H. & Case, A. L. (2006) The ecology and evolution of gender strategies in plants: the example of Australian *Wurmba* (Colchicaceae). *Australian journal of Botany*, **54**, 417-433.
- Barrett, S. C. H. & Harder, L. D. (1996) Ecology and evolution of plant mating. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**, A73-A79.
- Barrett, S. C. H., Kohn, J. R. & Cruzan, M. B. (1992) Experimental studies of mating-system evolution: the marriage of marker genes and floral biology. *Ecology and evolution of plant reproduction* (ed R. Wyatt), pp. 192-230. Chapman & Hall, New York.
- Bartomeus, I., Bosch, J. & Vila, M. (2008) High invasive pollen transfer, yet low deposition on native stigmas in a *Carpobrotus*-invaded community. *Annals of Botany*, **102**, 417-424.
- Bateman, A. J. (1948) Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, **2**, 349-68.
- Becerra, J. X. & Lloyd, D. G. (1992) Competition-dependent abscission of self-pollinated flowers of *Phormium tenax* (Agavaceae): A second action of self-incompatibility at the whole flower level? *Evolution*, **46**, 458-469.
- Biesmeijer, J. C., Roberts, S. P. M., Reemer, M., Ohlemuller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A. P., Potts, S. G., Kleukers, R., Thomas, C. D., Settele, J. & Kunin, W. E. (2006) Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, **313**, 351-354.
- Bond, W. J. (1994) Do mutualisms matter? Assessing the impact of pollinator and disperser disruption on plant extinction. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, **344**, 83-90.
- Bosch, J. (1992) Floral biology and pollinators of three co-occurring *Cistus* species (Cistaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **109**, 39-55.
- Bosch, M. & Waser, N. M. (1999) Effects of local density on pollination and reproduction in *Delphinium nuttallianum* and *Aconitum columbianum* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, **86**, 871-879.
- Bronstein, J. L. (2001) The exploitation of mutualisms. *Ecology Letters*, **4**, 277-287.
- Bronstein, J. L., Gouyon, P. H., Gliddon, C., Kjellberg, F. & Michaloud, G. (1990) The ecological consequences of flowering asynchrony in monoecious figs: a simulation study. *Ecology*, **71**, 2145-2156.
- Brosi, B. J., Daily, G. C., Shih, T. M., Oviedo, F. & Duran, G. (2008) The effects of forest fragmentation on bee communities in tropical countryside. *Journal of Applied Ecology*, **45**, 773-783.
- Brown, B. J. & Mitchell, R. J. (2001) Competition for pollination: effects of pollen of an invasive plant on seed set of a native congener. *Oecologia*, **129**, 43-49.
- Brown, J. H. (1984) On the relationship between abundance and distribution of species. *American Naturalist*, **124**, 255-279.
- Brys, R. & Jacquemyn, H. (2011) Variation in the functioning of autonomous self-pollination, pollinator services and floral traits in three *Centaureum* species. *Annals of Botany*, **107**, 917-925.
- Buchmann, S. L. (1983) Buzz pollination in angiosperms. *Handbook of experimental pollination biology* (eds C. E. Jones & J. R. Little), pp. 73-113. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Burd, M. (1994) Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. *Botanical Review*, **60**, 83-139.
- Busch, J. W. (2011) Demography, pollination, and Baker's law. *Evolution*, **65**, 1511-1513.
- Byers, D. L. & Waller, D. M. (1999) Do plant populations purge their genetic load? Effects of population size and mating history on inbreeding depression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **30**, 479-513.

- Campbell, D. R. (1991) Comparing pollen dispersal and gene flow in a natural population. *Evolution*, **45**, 1965-1968.
- Campbell, L. G. & Husband, B. C. (2007) Small populations are mate-poor but pollinator-rich in a rare, self-incompatible plant, *Hymenoxys herbacea* (Asteraceae). *New Phytologist*, **174**, 915-925.
- Cane, J. H. (2001) Habitat fragmentation and native bees: a premature verdict? *Conservation Ecology*, **5**, art. no.-3.
- Cane, J. H., Minckley, R. L., Kervin, L. J., Roulston, T. H. & Williams, N. M. (2006) Complex responses within a desert bee guild (Hymenoptera : Apiformes) to urban habitat fragmentation. *Ecological Applications*, **16**, 632-644.
- Caruso, C. M. (2002) Influence of plant abundance on pollination and selection on floral traits of *Ipomopsis aggregata*. *Ecology*, **83**, 241-254.
- Casper, B. B. (1988) Evidence for selective embryo abortion in *Cryptantha flava*. *American Naturalist*, **132**, 318-326.
- Charlesworth, B., Charlesworth, D. & Morgan, M. T. (1990) Genetic loads and estimates of mutation rates in highly inbred plant populations. *Nature*, **347**, 380-382.
- Charlesworth, B., Morgan, M. T. & Charlesworth, D. (1991) Multilocus models of inbreeding depression with synergistic selection and partial self-fertilization. *Genetical Research*, **57**, 177-194.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 237-268.
- Charlesworth, D., Morgan, M. T. & Charlesworth, B. (1990) Inbreeding depression, genetic load, and the evolution of outcrossing rates in a multilocus system with no linkage. *Evolution*, **44**, 1469-1489.
- Cheptou, P. O. (2011) Clarifying Baker's law. *Annals of Botany*.
- Cheptou, P. O. & Avendano, L. G. (2006) Pollination processes and the Allee effect in highly fragmented populations: consequences for the mating system in urban environments. *New Phytologist*, **172**, 774-783.
- Cheptou, P. O. & Donohue, K. (2010) Environment-dependent inbreeding depression: its ecological and evolutionary significance. *New Phytologist*, **189**, 395-407.
- Cheptou, P. O., Lepart, J. & Escarre, J. (2002) Mating system variation along a successional gradient in the allogamous and colonizing plant *Crepis sancta* (Asteraceae). *Journal of Evolutionary Biology*, **15**, 753-762.
- Cheptou, P. O. & Schoen, D. J. (2002) The cost of fluctuating inbreeding depression. *Evolution*, **56**, 1059-1062.
- Cheptou, P. O. & Schoen, D. J. (2007) Combining population genetics and demographical approaches in evolutionary studies of plant mating systems. *Oikos*, **116**, 271-279.
- Chittka, L., Thomson, J. D. & Waser, N. M. (1999) Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften*, **86**, 361-377.
- Cresswell, J. E. & Osborne, J. L. (2004) The effect of patch size and separation on bumblebee foraging in oilseed rape: implications for gene flow. *Journal of Applied Ecology*, **41**, 539-546.
- Cruden, R. W. (1972) Pollination in high elevation ecosystems: relative effectiveness of birds and bees. *Science*, **176**, 1439-1440.
- Cruden, R. W. (1977) Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, **31**, 32-46.
- Cruzan, M. B. & Barrett, S. C. H. (1993) Contribution of cryptic incompatibility to the mating system of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Evolution*, **47**, 925-934.

- Cunningham, S. A. (2000) Effects of habitat fragmentation on the reproductive ecology of four plant species in mallee woodland. *Conservation Biology*, **14**, 758-768.
- Dafni, A. & Firmage, D. (2000) Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*, **222**, 113-132.
- Darwin, C. (1862) *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilized by insects*. John Murray, London, UK.
- Darwin, C. (1876) *The effects of cross and self fertilization in the vegetable kingdom*. John Murray, London, UK.
- Darwin, C. (1877) *The different forms of flowers on plants of the same species*. Appleton, New York, NY.
- Dauber, J., Biesmeijer, J. C., Gabriel, D., Kunin, W. E., Lamborn, E., Meyer, B., Nielsen, A., Potts, S. G., Roberts, S. P. M., Sober, V., Settele, J., Steffan-Dewenter, I., Stout, J. C., Teder, T., Tscheulin, T., Vivarelli, D. & Petanidou, T. (2010) Effects of patch size and density on flower visitation and seed set of wild plants: a pan-European approach. *Journal of Ecology*, **98**, 188-196.
- de Jong, T. J., Waser, N. M. & Klinkhamer, P. G. L. (1993) Geitonogamy: The neglected side of selfing. *Trends in Ecology & Evolution*, **8**, 321-325.
- de Nettancourt, D. (1997) Self-incompatibility in angiosperms. *Sex. Plant. Reprod.*, **10**, 185-199.
- Dendauw, J., De Riek, J., Arens, P., Van Bockstaele, E., Vosman, B. & De Loose, M. (2001) Development of sequenced tagged microsatellite site (STMS) markers in *Azalea*. *Proceedings of the International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture* pp. 193-197.
- Dickinson, H. G. (1994) Self-pollination: simply a social disease. *Nature*, **367**, 517-518.
- Diekotter, T., Haynes, K. J., Mazeffa, D. & Crist, T. O. (2007) Direct and indirect effects of habitat area and matrix composition on species interactions among flower-visiting insects. *Oikos*, **116**, 1588-1598.
- Dominguez, C. A., Abarca, C. A., Eguiarte, L. E. & Molina-Freaner, F. (2005) Local genetic differentiation among populations of the mass-flowering tropical shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *New Phytologist*, **166**, 663-672.
- Dormont, L., Delle-Vedove, R., Bessiere, J. M., Hossaert-Mc Key, M. & Schatz, B. (2010) Rare white-flowered morphs increase the reproductive success of common purple morphs in a food-deceptive orchid. *New Phytologist*, **185**, 300-310.
- Dowrick (1956) Heterostyly in *Primula obconika*. *Heredity*, **10**, 219-236.
- Duncan, D. H., Nicotra, A. B., Wood, J. T. & Cunningham, S. A. (2004) Plant isolation reduces outcross pollen receipt in a partially self-compatible herb. *Journal of Ecology*, **92**, 977-985.
- Eckert, C. G. (2000) Contributions of autogamy and geitonogamy to self-fertilization in a mass-flowering, clonal plant. *Ecology*, **81**, 532-542.
- Eckert, C. G. & Allen, M. (1997) Cryptic self-incompatibility in tristylous *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *American Journal of Botany*, **84**, 1391-1397.
- Eckert, C. G. & Barrett, S. C. H. (1994) Inbreeding depression in partially self-fertilizing *Decodon verticillatus* (Lythraceae): population-genetic and experimental analyses. *Evolution*, **48**, 952-964.
- Eckert, C. G., Kalisz, S., Geber, M. A., Sargent, R., Elle, E., Cheptou, P. O., Goodwillie, C., Johnston, M. O., Kelly, J. K., Moeller, D. A., Porcher, E., Ree, R. H., Vallejo-Marin, M. & Winn, A. A. (2010) Plant mating systems in a changing world. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**, 35-43.
- Eckert, C. G., Samis, K. E. & Dart, S. (2006) Reproductive assurance and the evolution of uniparental reproduction in flowering plants. *Ecology and Evolution of Flowers* (eds L. D. Harder & S. C. H. Barrett), pp. 183-203. Oxford University Press.

- Ellstrand, N. C. & Elam, D. R. (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 217-242.
- Emms, S. K., Stratton, D. A. & Snow, A. A. (1997) The effect of inflorescence size on male fitness: experimental tests in the andromonoecious lily, *Zigadenus paniculatus*. *Evolution*, **51**, 1481-1489.
- Escaravage, N., Flubacker, E., Pornon, A., Doche, B. & Till-Bottraud, I. (2001) Stamen dimorphism in *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae): Development and function. *American Journal of Botany*, **88**, 68-75.
- Escaravage, N., Pornon, A., Doche, B. & TillBottraud, I. (1997) Breeding system in an alpine species: *Rhododendron ferrugineum* L (Ericaceae) in the French northern Alps. *Canadian journal of botany*, **75**, 736-743.
- Escaravage, N., Questiau, S., Pornon, A., Doche, B. & Taberlet, P. (1998) Clonal diversity in a *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) population inferred from AFLP markers. *Molecular Ecology*, **7**, 975-982.
- Escaravage, N. & Wagner, J. (2004) Pollination effectiveness and pollen dispersal in a *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) population. *Plant Biology*, **6**, 606-615.
- Feldman, T. S. (2006) Pollinator aggregative and functional responses to flower density: does pollinator response to patches of plants accelerate at low-densities? *Oikos*, **115**, 128-140.
- Fisher, R. A. (1941) Average excess and average effect of a gene substitution. *Annals of Eugenics*, **11**, 53-63.
- Fishman, L. & Wyatt, R. (1999) Pollinator-mediated competition, reproductive character displacement, and the evolution of selfing in *Arenaria uniflora* (Caryophyllaceae). *Evolution*, **53**, 1723-1733.
- Franceschinelli, E. V. & Bawa, K. S. (1999) The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity*, **84**, 116-123.
- Geber, M. A. & Moeller, D. A. (2006) Pollinator responses to plant communities and implications for reproductive character evolution. *The ecology and evolution of flowers* (eds L. D. Harder & S. C. H. Barrett), pp. 102-119. Oxford University Press.
- Geer, S. M., Tepedino, V. J., Griswold, T. L. & Bowlin, V. R. (1995) Pollinator sharing by three sympatric milkvetches, including the endangered species *Astragalus montii*. *Great Basin Naturalist*, **55**, 19-28.
- Gegear, R. J. & Lavery, T. M. (2005) Flower constancy in bumblebees: a test of the trait variability hypothesis. *Animal behavior*, **69**, 939-949.
- Ghazoul, J. (2005a) Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 367-373.
- Ghazoul, J. (2005b) Pollen and seed dispersal among dispersed plants. *Biological Reviews*, **80**, 413-443.
- Ghazoul, J. (2005c) Response to Steffan-Dewenter et al.: Questioning the global pollination crisis. *Trends in Ecology & Evolution*, **12**, 652-653.
- Ghazoul, J. (2006) Floral diversity and the facilitation of pollination. *Journal of Ecology*, **94**, 295-304.
- Ghazoul, J., Liston, K. A. & Boyle, T. J. B. (1998) Disturbance-induced density-dependent seed set in *Shorea siamensis* (Dipterocarpaceae), a tropical forest tree. *Journal of Ecology*, **86**, 462-473.
- Gigord, L. D. B., Macnair, M. R., Stritesky, M. & Smithson, A. (2002) The potential for floral mimicry in rewardless orchids: an experimental study. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **269**, 1389-1395.
- Goodwillie, C., Kalisz, S. & Eckert, C. G. (2005) The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **36**, 47-79.

- Goulson, D., Lye, G. C. & Darvill, B. (2008) Decline and conservation of bumble bees. *Annual Review of Entomology*, **53**, 191-208.
- Grant, V. (1949) Pollination systems as isolating mechanisms in angiosperms. *Evolution*, **3**, 82-97.
- Grant, V. (1994) Mechanical and ethological isolation between *Pedicularis groenlandica* and *P. attollens* (Scrophulariaceae). *Biologisches Zentralblatt*, **113**, 43-51.
- Griffin, C. A. M. & Eckert, C. G. (2003) Experimental analysis of biparental inbreeding in a self-fertilizing plant. *Evolution*, **57**, 1513-1519.
- Gross, C. L., Mackay, D. A. & Whalen, M. A. (2000) Aggregated flowering phenologies among three sympatric legumes - The degree of non-randomness and the effect of overlap on fruit set. *Plant Ecology*, **148**, 13-21.
- Harder, L. D. (1990) Behavioural responses by bumble bees to variation in pollen availability. *Oecologia*, **85**, 41-47.
- Harder, L. D. & Barrett, S. C. H. (1995) Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. *Nature*, **373**, 512-515.
- Harder, L. D. & Routley, M. B. (2006) Pollen and ovule fates and reproductive performance by flowering plants. *Ecology and evolution of flowers* (eds L. D. Lawrence & S. C. H. Barrett), pp. 61-80. Oxford University Press.
- Hargreaves, A. L., Harder, L. D. & Johnson, S. D. (2009) Consumptive emasculation: the ecological and evolutionary consequences of pollen theft. *Biological Reviews*, **84**, 259-276.
- Hegland, S. J., Grytnes, J. A. & Totland, O. (2009) The relative importance of positive and negative interactions for pollinator attraction in a plant community. *Ecological Research*, **24**, 929-936.
- Hegland, S. J. & Totland, O. (2008) Is the magnitude of pollen limitation in a plant community affected by pollinator visitation and plant species specialisation levels? *Oikos*, **117**, 883-891.
- Hengeveld, R. & Haeck, J. (1982) The distribution of abundance. I. Measurements. *Journal of Biogeography*, **9**, 303-316.
- Herlihy, C. R. & Eckert, C. G. (2002) Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilizing plant. *Nature*, **416**, 320-323.
- Herlihy, C. R. & Eckert, C. G. (2004) Experimental dissection of inbreeding and its adaptive significance in a flowering plant, *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae). *Evolution*, **58**, 2693-2703.
- Heslop-Harrison, Y. (2000) Control gates and micro-ecology: The pollen-stigma interaction in perspective. *Annals of Botany*, **85**, 5-13.
- Hirao, A. S., Kameyama, Y., Ohara, M., Isagi, Y. & Kudo, G. (2006) Seasonal changes in pollinator activity influence pollen dispersal and seed production of the alpine shrub *Rhododendron aureum* (Ericaceae). *Molecular Ecology*, **15**, 1165-1173.
- Hokanson, K. & Hancock, J. (2000) Early-acting inbreeding depression in three species of *Vaccinium* (Ericaceae). *Sexual Plant Reproduction*, 145-150.
- Holsinger, K. E. (1991) Mass-action models of plant mating systems: the evolutionary stability of mixed mating systems. *American Naturalist*, **138**, 606-622.
- Holsinger, K. E., Feldman, M. W. & Christiansen, F. B. (1984) The evolution of self-fertilization in plants: a population genetic model. *American Naturalist*, **124**, 446-453.
- Hooper, D. U., Chapin, F. S., Ewel, J. J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J. H., Lodge, D. M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A. J., Vandermeer, J. & Wardle, D. A. (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecological Monographs*, **75**, 3-35.
- Husband, B. C. & Schemske, D. W. (1996) Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, **50**, 54-70.
- Inouye, D. W. (1980) The terminology of floral larceny. *Ecology*, **61**, 1251-1253.

- Inouye, D. W. (1983) The ecology of nectar robbing. *The biology of nectaries* (eds B. Bentley & T. Elias), pp. 153-173. Columbia, University Press, New York.
- Irwin, R. E. & Brody, A. K. (1998) Nectar robbing in *Ipomopsis aggregata*: effects on pollinator behavior and plant fitness. *Oecologia*, **116**, 519-527.
- Irwin, R. E. & Brody, A. K. (1999) Nectar-robbing bumble bees reduce the fitness of *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae). *Ecology*, **80**, 1703-1712.
- Irwin, R. E., Brody, A. K. & Waser, N. M. (2001) The impact of floral larceny on individuals, populations, and communities. *Oecologia*, **129**, 161-168.
- Iserbyt, S., Durieux, E. A. & Rasmont, P. (2008) The remarkable diversity of bumblebees (Hymenoptera : Apidae : Bombus) in the Eyne Valley (France, Pyrenees-Orientales). *Annales De La Societe Entomologique De France*, **44**, 211-241.
- Jacquemart, A. L. & Thompson, J. D. (1996) Floral and pollination biology of three sympatric *Vaccinium* (Ericaceae) species in the Upper Ardennes, Belgium. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne De Botanique*, **74**, 210-221.
- Jain, S. K. (1976) The evolution of inbreeding in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **7**, 469-495.
- Jennersten, O. (1988) Pollination in *Dianthus deltooides* (Caryophyllaceae): effects of habitat fragmentation on visitation and seed set. *Conservation Biology*, **2**, 359-366.
- Johnson, S. D. & Steiner, K. E. (2000) Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, 140-143.
- Johnston, M. O., Porcher, E., Cheptou, P. O., Eckert, C. G., Elle, E., Geber, M. A., Kalisz, S., Kelly, J. K., Moeller, D. A., Vallejo-Marin, M. & Winn, A. A. (2009) Correlations among Fertility Components Can Maintain Mixed Mating in Plants. *American Naturalist*, **173**, 1-11.
- Jones, D. F. (1928) *Selective fertilization*. University of Chicago Press, Chicago.
- Kalisz, S., Vogler, D., Fails, B., Finer, M., Shepard, E., Herman, T. & Gonzales, R. (1999) The mechanism of delayed selfing in *Collinsia verna* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, **86**, 1239-1247.
- Kalisz, S. & Vogler, D. W. (2003) Benefits of autonomous selfing under unpredictable pollinator environments. *Ecology*, **84**, 2928-2942.
- Kalisz, S., Vogler, D. W. & Hanley, K. M. (2004) Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature*, **430**, 884-887.
- Karron, J. D., Jackson, R. T., Thumser, N. N. & Schlicht, S. L. (1997) Outcrossing rates of individual *Mimulus ringens* genets are correlated with anther-stigma separation. *Heredity*, **79**, 365-370.
- Karron, J. D., Mitchell, R. J., Holmquist, K. G., Bell, J. M. & Funk, B. (2004) The influence of floral display size on selfing rates in *Mimulus ringens*. *Heredity*, **92**, 242-248.
- Karron, J. D., Thumser, N. N., Tucker, R. & Hesseauer, A. J. (1995) The influence of population density on outcrossing rates in *Mimulus ringens*. *Heredity*, **75**, 175-180.
- Kennedy, B. F. & Elle, E. (2008) The reproductive assurance benefit of selfing: importance of flower size and population size. *Oecologia*, **155**, 469-477.
- Kephart, S. R., Brown, E. & Hall, J. (1999) Inbreeding depression and partial selfing: evolutionary implications of mixed-mating in a coastal endemic, *Silene douglasii* var. *oraria* (Caryophyllaceae). *Heredity*, **82**, 543-554.
- Knight, T. M., Steets, J. A., Vamosi, J. C., Mazer, S. J., Burd, M., Campbell, D. R., Dudash, M. R., Johnston, M. O., Mitchell, R. J. & Ashman, T. L. (2005) Pollen limitation of plant reproduction: Pattern and process. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **36**, 467-497.
- Knudsen, J. T. & Olesen, M. J. (1993) Buzz-pollination and patterns in sexual traits in north european Pyrolaceae. *American Journal of Botany*, **80**, 900-913.

- Kölreuter, J. G. (1761-1766) *Vorläufige Nachricht von einigen das Geschlecht der Pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungen*. Gleditsch, Leipzig.
- Korbecka, G., Klinkhamer, P. G. L. & Vrieling, K. (2002) Selective embryo abortion hypothesis revisited - A molecular approach. *Plant Biology*, **4**, 298-310.
- Kremen, C., Williams, N. M., Aizen, M. A., Gemmill-Herren, B., LeBuhn, G., Minckley, R., Packer, L., Potts, S. G., Roulston, T., Steffan-Dewenter, I., Vazquez, D. P., Winfree, R., Adams, L., Crone, E. E., Greenleaf, S. S., Keitt, T. H., Klein, A. M., Regetz, J. & Ricketts, T. H. (2007) Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecology Letters*, **10**, 299-314.
- Kunin, W. E. (1993) Sex and the single mustard: population density and pollinator behavior effects on seed-set. *Ecology*, **74**, 2145-2160.
- Kunin, W. E. (1997) Population size and density effects in pollination: Pollinator foraging and plant reproductive success in experimental arrays of *Brassica kaber*. *Journal of Ecology*, **85**, 225-234.
- Lande, R. & Schemske, D. W. (1985) The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetics models. *Evolution*, **39**, 24-40.
- Lande, R., Schemske, D. W. & Schultz, S. T. (1994) High inbreeding depression, selective interference among loci, and the threshold selfing rate for purging recessive lethal mutations. *Evolution*, **48**, 965-978.
- Larson, B. M. H. & Barrett, S. C. H. (2000) A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, **69**, 503-520.
- Laverty, T. M. (1992) Plant interactions for pollinator visits: a test of the magnet species effect. *Oecologia*, **89**, 502-508.
- Lawton, J. H. (1993) Range, population abundance and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, **8**, 409-413.
- Lazaro, A., Lundgren, R. & Totland, O. (2009) Co-flowering neighbors influence the diversity and identity of pollinator groups visiting plant species. *Oikos*, **118**, 691-702.
- Lloyd, D. G. (1979) Some reproductive factors affecting the selection of self-fertilization in plants. *American Naturalist*, **113**, 67-79.
- Lloyd, D. G. (1987) Selection of offspring size at independence and other size-versus-number strategies. *American Naturalist*, **129**, 800-817.
- Lloyd, D. G. (1992) Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, **153**, 370-380.
- Lloyd, D. G. & Schoen, D. J. (1992) Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences*, **153**, 358-369.
- Llyod, D. G. (1992) Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, **153**, 370-380.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A., Hooper, D. U., Huston, M. A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D. & Wardle, D. A. (2001) Ecology - Biodiversity and ecosystem functioning: Current knowledge and future challenges. *Science*, **294**, 804-808.
- Mahy, G. & Jacquemart, A. L. (1998) Mating system of *Calluna vulgaris*: self-sterility and outcrossing estimations. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, **76**, 37-42.
- Maloof, J. E. & Inouye, D. W. (2000) Are nectar robbers cheaters or mutualists? *Ecology*, **81**, 2651-2661.
- Mani, M. S. (1962) *Introduction to high altitude entomology: insect life above timberline in the north-western Himalayas*. Methuen, London.
- Massol, F. & Cheptou, P. O. (2011) Evolutionary syndromes linking dispersal and mating system: the effect of autocorrelation in pollination conditions. *Evolution*, **65**, 591-598.

- McCall, C. & Primack, R. B. (1992) Influence of flower characteristics, weather, time of day, and season on insect visitation rates in three plant communities. *American Journal of Botany*, **79**, 434-442.
- McCollin, D., Moore, L. & Sparks, T. (2000) The flora of a cultural landscape: environmental determinants of change revealed using archival sources. *Biological Conservation*, **92**, 249-263.
- McDade, L. A. & Kinsman, S. (1980) The Impact of Floral Parasitism in Two Neotropical Hummingbird-Pollinated Plant Species. *Evolution*, **34**, 944-958.
- Michalski, S. G. & Durka, W. (2009) Pollination mode and life form strongly affect the relation between mating system and pollen to ovule ratios. *New Phytologist*, **183**, 470-479.
- Mitchell, R. J., Flanagan, R. J., Brown, B. J., Waser, N. M. & Karron, J. D. (2009) New frontiers in competition for pollination. *Annals of Botany*, **103**, 1403-1413.
- Moeller, D. A. (2004) Facilitative interactions among plants via shared pollinators. *Ecology*, **85**, 3289-3301.
- Moeller, D. A. (2006) Geographic structure of pollinator communities, reproductive assurance, and the evolution of self-pollination. *Ecology*, **87**, 1510-1522.
- Moeller, D. A. & Geber, M. A. (2005) Ecological context of the evolution of self-pollination in *Clarkia xantiana*: Population size, plant communities, and reproductive assurance. *Evolution*, **59**, 786-799.
- Molano-Flores, B. & Hendrix, S. D. (1999) The effects of population size and density on the reproductive output of *Anemone canadensis* L. (Ranunculaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **160**, 759-766.
- Morales, C. L. & Traveset, A. (2008) Interspecific pollen transfer: Magnitude, prevalence and consequences for plant fitness. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **27**, 221-238.
- Nagylaki, M. T. (1976) A model for the evolution of self-fertilization and vegetative reproduction. *Journal of Theoretical Biology*, **58**, 55-58.
- Naito, K., Isagi, Y. & Nakagoshi, N. (1998) Isolation and characterization of microsatellites of *Rhododendron metternichii* Sieb. et Zucc. var. *hondoense* Nakai. *Molecular Ecology*, **7**, 927-928.
- Nuortila, C., Tuomi, J. & Laine, K. (2002) Inter-parent distance affects reproductive success in two clonal dwarf shrubs, *Vaccinium myrtillus* and *Vaccinium vitis-idaea* (Ericaceae). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, **80**, 875-884.
- Olesen, J. M. & Jordano, P. (2002) Geographic patterns in plant-pollinator mutualistic networks. *Ecology*, **83**, 2416-2424.
- Ollerton, J., Johnson, S. D. & Hingston, A. B. (2006) Geographical variation in diversity and specificity of pollination systems. *Plantpollinator interactions, from specialization to generalization*. (eds N. M. Waser & J. Ollerton), pp. 283-308. Chicago, IL: Chicago University Press.
- Palmer, T. M., Stanton, M. L. & Young, T. P. (2003) Competition and coexistence: Exploring mechanisms that restrict and maintain diversity within mutualist guilds. *American Naturalist*, **162**, S63-S79.
- Pannell, J. R. (2009) On the problems of a closed marriage: celebrating Darwin 2000. *Biology Letters*, **5**, 332-335.
- Pleasants, J. M. (1980) Competition for bumblebee pollinators in Rocky Mountain plant communities. *Ecology*, **61**, 1446-1459.
- Pornon, A., Escaravage, N., Thomas, P. & Taberlet, P. (2000) Dynamics of genotypic structure in clonal *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) populations. *Molecular Ecology*, **9**, 1099-1111.

- Pornon, A., Escaravage, N., TillBottraud, I. & Doche, B. (1997) Variation of reproductive traits in *Rhododendron ferrugineum* L (Ericaceae) populations along a successional gradient. *Plant Ecology*, **130**, 1-11.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. & Kunin, W. E. (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**, 345-353.
- Potts, S. G., Petanidou, T., Roberts, S., O'Toole, C., Hulbert, A. & Willmer, P. (2006) Plant-pollinator biodiversity and pollination services in a complex Mediterranean landscape. *Biological Conservation*, **129**, 519-529.
- Potts, S. G., Roberts, S. P. M., Dean, R., Marris, G., Brown, M. A., Jones, R., Neumann, P. & Settele, J. (2010) Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*, **49**, 15-22.
- Price, S. C. & Jain, S. K. (1981) Are inbreeders better colonizers? *Oecologia (Berlin)*, **49**, 283-286.
- Ramsey, M. & Vaughton, G. (1996) Inbreeding depression and pollinator availability in a partially self-fertile perennial herb *Blandfordia grandiflora* (Liliaceae). *Oikos*, **76**, 465-474.
- Rasmont, P. & Mersch, P. (1988) Première estimation de la dérive faunique chez les bourdons de la Belgique (Hymenoptera, Apidae). *Ann. Soc. R. Zool. Belg.*, **118**, 141-147.
- Raspe, O., Guillaume, P. & Jacquemart, A. L. (2004) Inbreeding depression and biased paternity after mixed-pollination in *Vaccinium myrtillus* L. (Ericaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **165**, 765-771.
- Rathcke, B. & Real, L. (1993) Autogamy and inbreeding depression in mountain-laurel, *Kalmia latifolia* (Ericaceae). *American Journal of Botany*, **80**, 143-146.
- Rathcke, B. J. (1983) Competition and facilitation among plants for pollination. *Pollination Biology* (ed L. Real), pp. 305-329. Academic press, New York.
- Reddy, T. B., Rangaiah, K., Reddi, E. U. B. & Reddi, C. S. (1992) Consequences of nectar robbing in the pollination ecology of *Vitex negundo* (Verbenaceae). *Current Science*, **62**, 690-691.
- Renner, S. S. (1998) Effects of habitat fragmentation of plant pollinator interactions in the tropics. *Dynamics of tropical communities* (eds D. M. Newbery, H. H. T. Prins & N. D. Brown), pp. 339-360. Blackwell Science, London, UK.
- Richards, A. J. (1986) *Plant breeding systems*. George Allen & Unwin, London.
- Rigney, L. P. (1995) Postfertilization causes of differential success of pollen donors in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae): nonrandom ovule abortion. *American Journal of Botany*, **82**, 578-584.
- Ritland, K. (1990a) Inferences about inbreeding depression based on changes of the inbreeding coefficient. *Evolution*, **44**, 1230-1241.
- Ritland, K. (1990b) A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. *Journal of Heredity*, **81**, 235-237.
- Ritland, K. (2002) Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity*, **88**, 221-228.
- Ritland, K. & Jain, S. (1981) A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity*, **47**, 35-52.
- Ronfort, J. & Couvet, D. (1995) A stochastic model of selection on selfing rates in structured populations. *Genetical Research*, **65**, 209-222.
- Routley, M. B., Mavraganis, K. & Eckert, C. G. (1999) Effect of population size on the mating system in a self-compatible, autogamous plant, *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae). *Heredity*, **82**, 518-528.
- Ruan, C. J., Qin, P. & da Silva, J. A. T. (2010) Relationship between reproductive assurance and mixed mating in perennial *Kosteletzkya virginica*. *South African Journal of Botany*, **77**, 280-291.

- Runions, C. J. & Geber, M. A. (2000) Evolution of the self-pollinating flower in *Clarkia xantiana* (Onagraceae). I. Size and development of floral organs. *American Journal of Botany*, **87**, 1439-1451.
- Sargent, R. D. & Ackerly, D. D. (2008) Plant-pollinator interactions and the assembly of plant communities. *Trends in Ecology & Evolution*, **23**, 123-130.
- Sargent, R. D., Kembel, S. W., Emery, N. C., Forrestel, E. J. & Ackerly, D. D. (2011) Effect of local community phylogenetic structure on pollen limitation in an obligately insect-pollinated plant. *American Journal of Botany*, **98**, 283-289.
- Sargent, R. D. & Otto, S. P. (2006) The role of local species abundance in the evolution of pollinator attraction in flowering plants. *American Naturalist*, **167**, 67-80.
- Schmid-Hempel, P. & Speiser, B. (1988) Effects of inflorescence size on pollination in *Epilobium angustifolium*. *Oikos*, **53**, 98-104.
- Schmit, J. (1983) Density-dependent pollinator foraging, flowering phenology, and temporal pollen dispersal patterns in *Linanthus bicolor*. *Evolution*, **37**.
- Schoen, D. J. & Lloyd, D. G. (1992) Self-and cross-fertilization in plants. III. Methods for studying modes and functional aspects of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, **153**, 381-393.
- Schoen, D. J., Morgan, M. T. & Bataillon, T. (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**, 1281-1290.
- Schuett, E. M. & Vamosi, J. C. (2010) Phylogenetic Community Context Influences Pollen Delivery to *Allium cernuum*. *Evolutionary Biology*, **37**, 19-28.
- Schulke, B. & Waser, N. M. (2001) Long-distance pollinator flights and pollen dispersal between populations of *Delphinium nuttallianum*. *Oecologia*, **127**, 239-245.
- Schweiger, O., Biesmeijer, J. C., Bommarco, R., Hickler, T., Hulme, P. E., Klotz, S., Kuhn, I., Moora, M., Nielsen, A., Ohlemuller, R., Petanidou, T., Potts, S. G., Pysek, P., Stout, J. C., Sykes, M. T., Tscheulin, T., Vila, M., Walther, G. R., Westphal, C., Winter, M., Zobel, M. & Settele, J. (2010) Multiple stressors on biotic interactions: how climate change and alien species interact to affect pollination. *Biological Reviews*, **85**, 777-795.
- Seavey, S. R. & Bawa, K. S. (1986) Late-acting selfincompatibility in angiosperms. *Bot. Rev.*, **52**, 195-219.
- Shivanna, K. R. & Johri, B. M. (1989) *The Angiosperm pollen, structure and function*. John Wiley and Sons.
- Snow, A. A., Spira, T. P., Simpson, R. & Klips, R. A. (1996) The ecology of geitonogamous pollination. *Floral biology. Studies on floral evolution in animal-pollinated plants* (eds D. G. Lloyd & S. C. H. Barrett), pp. 191-216. Chapman and Hall, New York, USA.
- Spaethe, J., Tautz, J. & Chittka, L. (2001) Visual constraints in foraging bumblebees: Flower size and color affect search time and flight behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 3898-3903.
- Spira, T. P. (2001) Plant-pollinator interactions: A threatened mutualism with implications for the ecology and management of rare plants. *Natural Areas Journal*, **21**, 78-88.
- Sprecht, R. I. (1996) Heathland and related shrubland. *Heathland and related shrubland* (ed R. I. Sprecht), pp. 1-18. Elsevier Scientific Publishing.
- Sprengel, C. K. (1793) *Das entdeckte Geheimniss der Natur im Bau und in der Befruchtung der Blumen.*, Berlin.
- Stebbins, G. L. (1970) Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **1**, 307-326.

- Stebbins, G. L. (1974) *Flowering Plants, Evolution Above the Species Level*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Taki, H. & Kevan, P. G. (2007) Does habitat loss affect the communities of plants and insects equally in plant-pollinator interactions? Preliminary findings. *Biodiversity and Conservation*, **16**, 3147-3161.
- Thakar, J. D., Kunte, K., Chauhan, A. K., Watve, A. V. & Watve, M. G. (2003) Nectarless flowers: ecological correlates and evolutionary stability. *Oecologia*, **136**, 565-570.
- Thebault, E. & Fontaine, C. (2010) Stability of Ecological Communities and the Architecture of Mutualistic and Trophic Networks. *Science*, **329**, 853-856.
- Thomson, J. D. (1981) Spatial and temporal components of resource assessment by flower-feeding insects. *Journal of Animal Ecology*, **50**, 49-59.
- Ushimaru, A. & Kikuzawa, K. (1999) Variation of breeding system, floral rewards, and reproductive success in clonal *Calystegia* species (Convolvulaceae). *American Journal of Botany*, **86**, 436-446.
- Uyenoyama, M. K., Holsinger, K. E. & Waller, D. M. (1993) Ecological and genetic factors directing the evolution of self-fertilization. *Evolutionary Biology*, **9**, 327-381.
- Vamosi, J. C., Knight, T. M., Steets, J. A., Mazer, S. J., Burd, M. & Ashman, T. L. (2006) Pollination decays in biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 956-961.
- Van Engelsdorp, D., Hayes Jr., J., Underwood, R. M. & Pettis, J. (2008) A survey of honey bee colony losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. *Plos One*, **e4071**, 1-6.
- van Kleunen, M. & Ritland, K. (2004) Predicting evolution of floral traits associated with mating system in a natural plant population. *Journal of Evolutionary Biology*, **17**, 1389-1399.
- Vaughton, G. & Ramsey, M. (2010) Pollinator-mediated selfing erodes the flexibility of the best-of-both-worlds mating strategy in *Bulbine vagans*. *Functional Ecology*, **24**, 374-382.
- Wagenius, S. & Lyon, S. P. (2010) Reproduction of *Echinacea angustifolia* in fragmented prairie is pollen-limited but not pollinator-limited. *Ecology*, **91**, 733-742.
- Waites, A. R. & Agren, J. (2004) Pollinator visitation, stigmatic pollen loads and among-population variation in seed set in *Lythrum salicaria*. *Journal of Ecology*, **92**, 512-526.
- Ward, M., Dick, C. W., Gribel, R. & Lowe, A. J. (2005) To self, or not to self ... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity*, **95**, 246-254.
- Waser, N. M. (1978) Interspecific pollen transfer and competition between co-occurring plant species. *Oecologia*, **36**, 223-236.
- Waser, N. M. (1983) Competition for pollination and floral character differences among sympatric plant species: a review of evidence. *Handbook of Experimental Pollination Biology* (eds E. Jones & R. J. Little), pp. 277-293. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Waser, N. M. (1996) Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, **77**, 1043-1060.
- Waser, N. M. & Price, M. V. (1983) Optimal and actual outcrossing in plants, and the nature of plant-pollinator interaction. *Handbook of Experimental Pollination Biology* (eds C. E. Jones & R. J. Little), pp. 341-359. Scientific and Academic Editions, New York.
- Webb, C. O., Ackerly, D. D., McPeck, M. A. & Donoghue, M. J. (2002) Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 475-505.
- Wiens, J. J., Ackerly, D. D., Allen, A. P., Anacker, B. L., Buckley, L. B., Cornell, H. V., Damschen, E. I., Davies, T. J., Grytnes, J. A., Harrison, S. P., Hawkins, B. A., Holt, R. D., McCain, C. M. & Stephens, P. R. (2010) Niche conservatism as an emerging principle in ecology and conservation biology. *Ecology Letters*, **13**, 1310-1324.

- Wilcock, C. & Neiland, R. (2002) Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science*, **7**, 270-277.
- Winfree, R., Aguilar, R., Vazquez, D. P., LeBuhn, G. & Aizen, M. A. (2009) A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology*, **90**, 2068-2076.

ANNEXES

ANNEXE 1: RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES - A MASS-FLOWERING SPECIES SHAPES THE PHYLOGENETIC STRUCTURE OF ITS SURROUNDING COMMUNITY

Plant-pollinator interactions have recently been proposed to influence community assembly (Sargent & Ackerly, 2008). Mass-flowering species have the ability to attract and monopolize pollinators from the community. The abundance of mass-flowering species could affect plant-pollinator interactions and influence coflowering plant species assemblage.

Here, we aim at assessing the effect of the floral display of a mass-flowering species on the density of open flowers, species richness and phylogenetic relationships of its surrounding community. We used a broad gradient of *R. ferrugineum* floral display within heathland patches. We studied the extent of pollinator sharing between *R. ferrugineum* and its surrounding community by using pollen load analysis.

MATERIALS AND METHODS

Study community

Heathland communities dominated and structured by the shrub *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) are widely and patchily distributed between 1400 and 2300 m a.s.l. in the Alps and the Pyrenees (Europe) (Ozenda, 1985). Because of their high ecological value, this natural heritage of flora must be locally preserved (COM, 1992). Each heathland patch is composed of *R. ferrugineum* and its surrounding flowering community. The within-patch *R. ferrugineum* floral availability is highly variable. Heathland spatial patterns mainly result from age-long burning and livestock grazing, decreasing the coverage of the focal species within heathlands and increasing the distance between heathland patches in meadow.

Rhododendron ferrugineum L. (Ericaceae) is an evergreen shrub with well branched trailing stems of 0.7-0.8 m height. This species is protandrous, self-compatible and reproduces both sexually and vegetatively through layering. Its massive floral display consists of numerous inflorescences of 5-22 bright red nectariferous tubular flowers and reaches in average more than 800 inflorescences per individual (Escaravage *et al.*, 1997; Pornon *et al.*, 1997). The flowering period of a population lasts for 20-30 days. Flowers last about 10 days

and are initiated the year before they mature (Escaravage et al., 1997). In a previous study, (Escaravage & Wagner, 2004) showed that the most efficient pollinators of *R. ferrugineum* are honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.) while Diptera (Muscid and Syrphid flies and Empididae), Lepidoptera and Coleoptera were secondary pollinators.

Study site and R. ferrugineum floral display

The study was conducted on a 3 km² area in the French Central Pyrenees (southern France), near the village of Camurac (42°46'31"N 01°55'45"E). Altitudes range from 1550 m to 1750 m a.s.l. and the snow cover usually lasts from late October until May. *R. ferrugineum* patches of the study site (n = 28) were spatially distributed into visually distinct aggregation of *Rhododendron* shrubs and separated from another patch by meadow. We used an estimation of total *R. ferrugineum* floral display within patches which integrates (i) the mean number of inflorescences per m² obtained by counting the number of inflorescences in a 0.25 x 0.25m plot placed on 20 haphazardly chosen individuals per patch, and (ii) the total area covered by *Rhododendron* within patches assessed from the area occupied by the focal species in a 400m² plot haphazardly placed at the patch core and the total surface of each heathland patch (m²). Patch area was obtained from geographic coordinates of patch perimeters recorded every 5 meters and analyzed in OziExplorer (GPS mapping software, version 3.95.4m, Des Newman). *R. ferrugineum* floral display within patches was estimated as the product of the mean density of inflorescences (/m²) and patch *Rhododendron* coverage (m²). Heathland patch areas ranged from 0.01 to 15.77 ha (1.73 ± 0.38 ha). Within heathland patches, the proportion of *R. ferrugineum* coverage ranged from 0.18% to 98% (the coverage of the surrounding community is 1 minus the coverage of *R. ferrugineum*). Overall, *R. ferrugineum* floral display ranged from 170 to 33,567,317 rhododendron inflorescences (mean: 2,529,257).

Composition of the surrounding community and flower density

In each heathland patch, we assessed mean flower density and species identity of the surrounding community (all non-graminoid plant species that coflowered with *R. ferrugineum*) by using 20 plots (50x50cm) randomly placed in each patch. We repeated this design twice during *R. ferrugineum* flowering period (two weeks apart). Each plot was

taken in picture for later analysis at the lab. To ensure the robustness of the method, we identified each species in bloom *in situ* and counted a mean number of open flowers per inflorescence (on 30 randomly chosen inflorescences per species) for species for which we were not able to count the number of open flower on the picture (e.g. *Ajuga reptans* or *Thymus serpyllifolium*). On each picture we identified the species and counted for each flowering plant the number open flowers (or the number of inflorescences before multiplying by the mean number of flowers per inflorescence). We obtained a mean flower density per patch by averaging the number of open flowers of the 20 x 2 plots per patch.

Phylogeny

We used Phylomatic (Webb *et al.*, 2006) to generate a phylogeny that included all plant species that coflowered with *R. ferrugineum* in each patch. Taxa were grafted onto the angiosperm consensus tree from (Davies *et al.*, 2004), which includes branch lengths based on estimated divergence times among taxa (Fig. 1). Species are not included in the megatree and species within a genus are returned as polytomies.

Community descriptors

We used the software Phylocom 3.41 (Webb *et al.*, 2008) to calculate the following descriptors of community diversity in each patch:

(i) Species richness, the total number of non-graminoid flowering species in the surrounding community (*R. ferrugineum* excluded) of each patch;

(ii) Faith's phylogenetic diversity (PD), a measure of the amount of phylogenetic diversity in the surrounding community in each patch, calculated as the sum of the branch lengths for taxa in a community (Faith 1994);

(iii) Nearest taxon index (NTI), A standardized measure of the phylogenetic distance to the nearest taxon (closest relative) for each taxon in the sample, which quantifies the extent of terminal clustering on the phylogeny (Webb *et al.*, 2002). Positive values indicate phylogenetic clustering (individual taxa are more closely related to co-occurring nearest relatives than expected by chance). Negative values indicate evenness.

(iv) Mean phylogenetic distance from the focal species (MPDF), An index that quantifies the average phylogenetic distance between each species in the surrounding

community and the focal species, *R. ferrugineum* (larger values indicate that individual species are on average more distantly related to *R. ferrugineum*; smaller values indicate that individual species are on average relatively closely related to *R. ferrugineum*).

We used the default null model from Phylocom in which species in each sample are random draws, without replacement, from the phylogeny pool. This asks whether the species are more phylogenetically clumped or even than expected by chance, given the regional species phylogeny we have specified (number of randomization was 999).

Visitor pollen loads

To assess visitor sharing between *R. ferrugineum* and its surrounding community, we estimated quantity and quality (rhododendron pollen versus surrounding community pollen) of total pollen carried by flower visitors (*Bombus* sp.). During one hour per patch we randomly collected bumblebees foraging either on *R. ferrugineum* or in the surrounding community in a subset of 16 patches representative of the whole gradient of plant spatial pattern. Forty four bumblebees were collected on *R. ferrugineum* and forty three were collected on flowers from the surrounding community. We collected the insects that exhibit a foraging behavior (i.e. entering within the corollas). In particular, nectar robbers of *R. ferrugineum* or coflowering species were not collected as they are not likely to act as pollinators. Insects were caught using a net, killed in ethyl acetate, stored in individual tubes and frozen until processed in the laboratory. Before pollen load analyses, we identified bumblebees to species level according to a reference collection of insects previously collected on the study site and identified by specialists (see Acknowledgements).

We systematically dabbed each insect with a small gelatin-fuchsin cub (Dafni, 1992) to sample and stain its pollen. The gel was placed on a slide, heated to melting point and covered with a cover slip after pollen homogenisation with a thin pin. Between insects, we thoroughly cleaned the forceps used during sampling. We avoided pollen storage areas such as pollen baskets on bumblebees as these contain pollen unlikely to be available for pollination and we assumed that the quality of the body's pollen load to be similar to that of the pollen baskets.

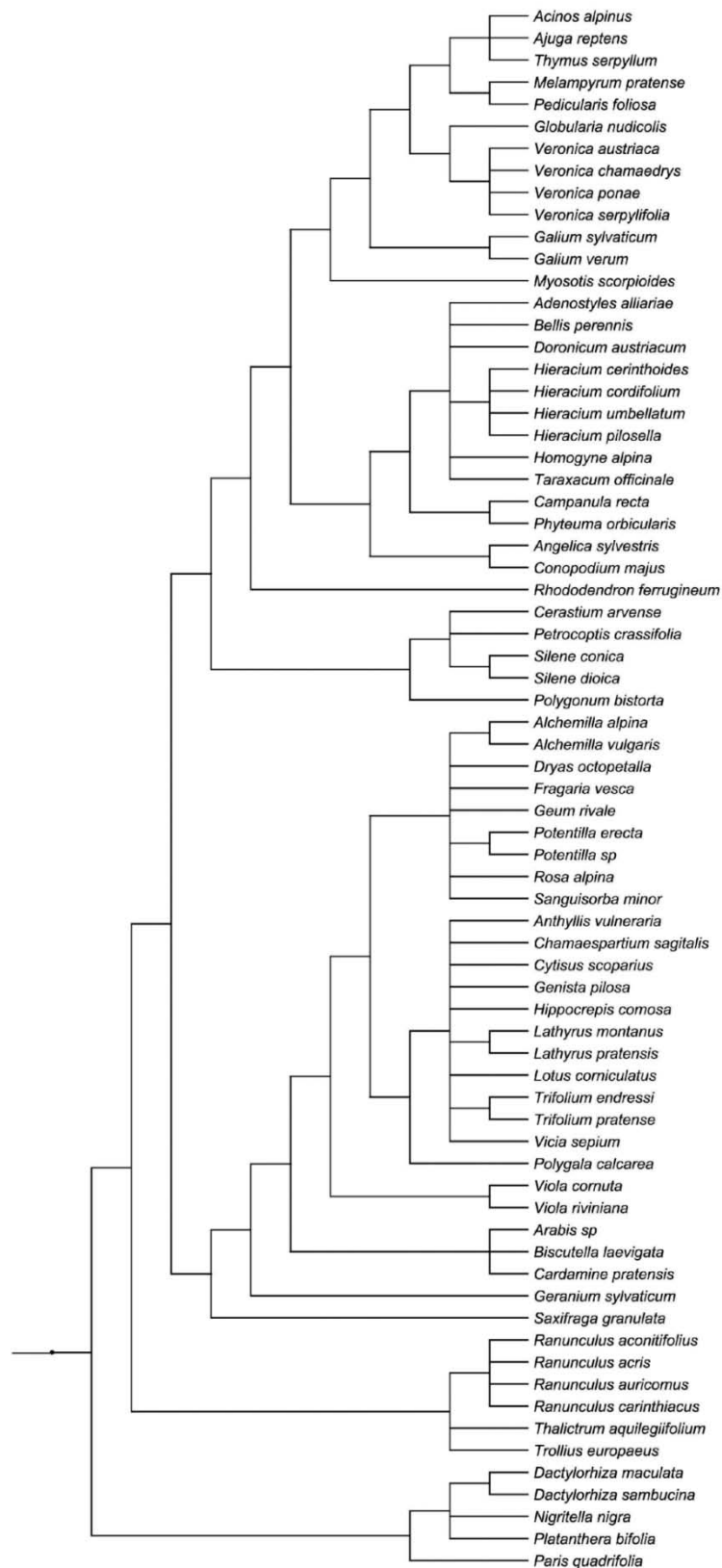


Figure 1. Phylogenetic relations used to create the phylodiversity statistics in the study. The An angiosperm consensus tree from Davies *et al.* 2004 was used to assemble the species list into phylogeny with the Phylomatic software package. (<http://www.phylodiversity.net/phylomatic>)

We performed pollen counts on each slide under a binocular microscope. We differentiated between *R. ferrugineum* pollen (tetrad pollen) and pollen from co-flowering plant species. During *R. ferrugineum* flowering period, no other Ericaceae with tetrad pollen was in bloom allowing the direct assessment of rhododendron pollen amount. When pollen quantity did not allow direct count (usually more than 1,000 pollen grains), we separated the slide into 100 squares of 1 mm² and counted and identified the pollen grains in 7 squares randomly placed on the slide. We assessed the total number of pollen grains by multiplying the mean number of grains per square by the total number of squares where pollen grains were found. The number of conspecific tetrads was multiplied by 4 to obtain the number of pollen grains. The pollen load of insects collected in the same patch was averaged to obtain a mean pollen load per patch and avoid pseudo-replication. We referred to pollen quantity as the absolute number of pollen grains counted and to pollen quality to distinguish rhododendron versus ‘surrounding community’ pollen (regardless of pollen viability or whether it is cross- or self-pollination). We did not identify pollen species since the focus of this study was on pollinator’s sharing between *R. ferrugineum* and its surrounding community rather than on pollen diversity.

To test the impact of *R. ferrugineum* floral display within patches on pollinator pollen loads (quantity of rhododendron, “surrounding community” and total pollen grains), we used Generalized Linear Mixed Models (GLIMMIX procedure in SAS, software package, v. 9.1, SAS Institute 2003) with Poisson error and an overdispersion component to the variance function. We used quasi-likelihood estimation for proportions with unknown distribution to estimate the impact of *R. ferrugineum* floral display on the proportion of rhododendron pollen grains in pollinator and stigmatic pollen loads (McCullagh and Nelder 1989). Pollen load analyses of insects per patch were weighted by the number of insects collected in each patch.

RESULTS

Characteristics of the surrounding community

The surrounding community associated to *R. ferrugineum* within heathland patches was composed of 70 co-flowering entomophilous species across the study site and is dominated by *Cardamine pratensis*, *Conopodium majus*, *Lotus corniculatus*, *Polygala calcarea*, *Potentilla erecta* and *Ranunculus acris*.

The mean density of open flowers in the surrounding community of each patch ranged from 14.6 to 347.6 open flowers per m² with a mean of 29.8 open flowers per m². Species richness of the surrounding community per patch ranged from 5 to 30 species (mean of 15.5 species). Among phylogenetic indexes, PD ranged from 24 to 67 (mean of 44.9) and was logically positively related to the species richness ($R^2 = 0.94$; $P < 0.0001$). Mean phylogenetic distance (MPD) per patch ranged from 8.67 to 11.4 (mean of 10.03). We found that the observed MPD value was significantly lower than the expected MPD value based on chance alone in four patches only ($P < 0.05$, calculated as the number of runs in the randomization where the MPD random was higher than the observed MPD divided by 999+1, see Webb et al. 2008). NTI ranged from -1.74 to 2.58. Overall NTI (0.07) indicated that individual taxa are more closely related to co-occurring nearest relatives than expected by chance. We found a negative NTI index (indicated evenness) in 46% of patches. MPDF ranged from 7 to 9.71 (mean of 8.33).

The effect of R. ferrugineum floral display on the characteristics of the surrounding community

R. ferrugineum floral display per patch had a significant and negative effect on the mean flower density in the surrounding community ($R^2=0.22$; $P = 0.01$) and on the MPDF index ($R^2 0.60$; $P < 0.0001$). In other words, as *R. ferrugineum* floral availability increased, the density of open flowers in the surrounding community and the mean phylogenetic distance from *R. ferrugineum* decreased. There was no evidence for a significant relationship between *R. ferrugineum* floral display per patch and RS, NTI and PD ($R^2 = 0.014$, $P = 0.54$; $R^2 = 0.0008$, $P = 0.89$; $R^2 = 0.015$, $P = 0.53$, respectively).

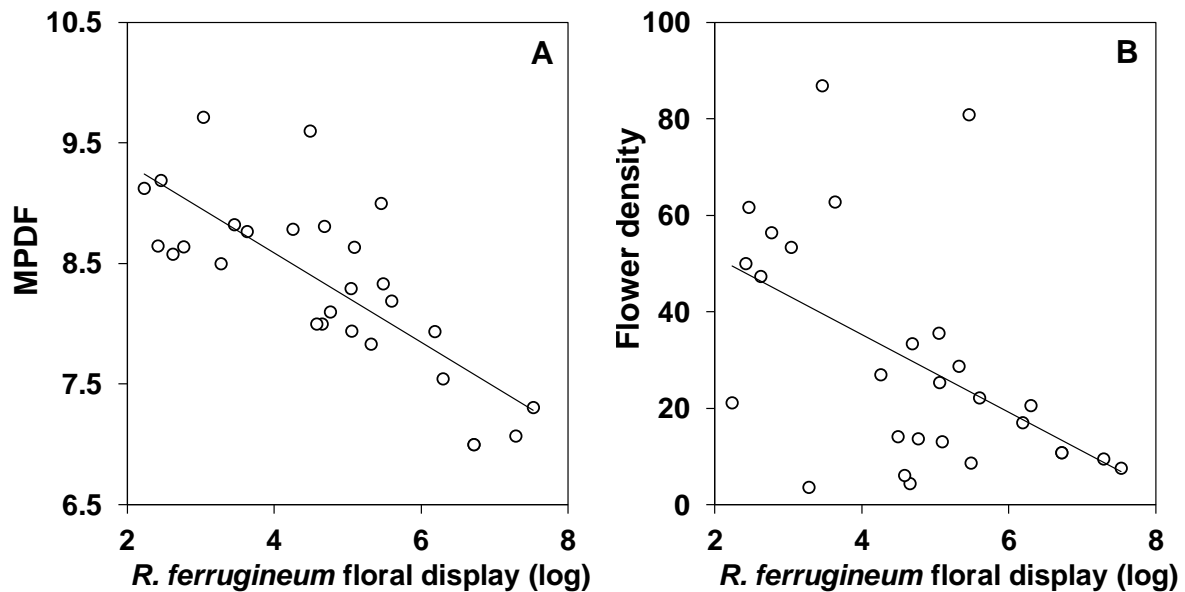


Figure 2. Relation between the floral display of *R. ferrugineum* and (A) mean phylogenetic distance from the focal species (*R. ferrugineum*) and (B) mean density of open flowers in the surrounding community.

Pollinator's pollen loads

A description of pollen load analyses is presented in Table 1. Every bumblebees collected on *R. ferrugineum* carried pollen from the surrounding community and 77 % of those collected in the surrounding community carried rhododendron pollen. Overall, the quantity of *R. ferrugineum* (RF) pollen and surrounding community (SC) pollen was highly variable among individuals resulting in large range of pollen load quantities and qualities. RF pollen quantity differ significantly between pollen loads from insects collected on *R. ferrugineum* and in the surrounding community ($F = 10.08_{1,85}$, $P = 0.0021$) while SC pollen quantity did not differ ($F = 2.57_{1,85}$, $P = 0.11$). Overall, the mean proportion of RF pollen recorded per insect was significantly higher when they are collected on *R. ferrugineum* than when they are collected in the surrounding community (70.8 % and 0.9 %, respectively, $F = 211.49_{1,85}$, $P < 0.0001$).

Table 1 Pollen load analyses of flower visitors (*Bombus spp.*) collected on *R. ferrugineum* and in the surrounding community within heathland patches.

	RF pollen		SC pollen		R. ferrugineum % per insect	
	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range
RF visitors n = 44	3,453.2	52 - 14,044	4,028.2	0 - 45,397	70.8	0.08 - 100
SC visitors n = 43	588.9	0 - 13,824	11,249.7	64 - 159,436	0.9	0 - 92.8

Sample sizes (n) represent the number of individuals insect used.

R. ferrugineum floral display had no significant effect on HP or on the total number of pollen grains carried whatever the visited-plant considered (Table 2). We found a positive relationship between CP quantities carried by bumblebees collected in the surrounding community while no relationship was found with CP loads from rhododendron visitors (Table 2). The average proportion of CP recorded per insect increased significantly with increasing *R. ferrugineum* floral display when insects are collected on *R. ferrugineum* and in the surrounding community (Table 2)

Table 3 Generalized linear mixed models for the relationship between *R. ferrugineum* floral display and pollen loads of *R. ferrugineum* and surrounding community flower visitor response variables: conspecific, heterospecific and total number of pollen grains and conspecific pollen proportion.

	Conspecific pollen		Heterospecific pollen		Total pollen		Conspecific pollen proportion	
	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>R. ferrugineum</i> n = 44	2.75 _{1,15}	0.12	0.75 _{1,15}	0.40	0 _{1,15}	0.99	13.59 _{1,15}	0.0024 (+)
Surrounding community n = 42	10.84 _{1,11}	0.0072	0.01 _{1,11}	0.91	0 _{1,11}	0.96	117.29 _{1,15}	<0.0001 (+)

Sample sizes (n) correspond to the number of patches included in the analyses. Bold values correspond to significant P value (< 0.05). Trends are shown in parentheses. Degrees of freedom are shown in subscript.

DISCUSSION

Here, we found that floral availability of a mass-flowering dominant species drives the assembly of coflowering species in the surrounding community. Mean phylogenetic distance between coflowering species and *R. ferrugineum* (MPDF) decreased as *R. ferrugineum* floral display increased. This is the first study highlighting the effect of a focal species on its phylogenetic distance to coflowering community. We showed that surrounding community visitors visit more frequently *R. ferrugineum* in large dense patches where MPDF is low.

REFERENCES

- COM (1992) Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. Official Journal of the European Communities L 206, 22.7 1992:7.
- Dafni, A. (1992) *Pollination Ecology: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Davies, T. J., Barraclough, T. G., Chase, M. W., Soltis, P. S., Soltis, D. E. & Savolainen, V. (2004) Darwin's abominable mystery: Insights from a supertree of the angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 1904-1909.
- Escaravage, N., Pornon, A., Doche, B. & TillBottraud, I. (1997) Breeding system in an alpine species: *Rhododendron ferrugineum* L (Ericaceae) in the French northern Alps. *Canadian journal of botany*, **75**, 736-743.
- Escaravage, N. & Wagner, J. (2004) Pollination effectiveness and pollen dispersal in a *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) population. *Plant Biology*, **6**, 606-615.
- Ozenda, P. (1985) *La végétation de la chaîne alpine dans l'espace montagnard européen*. Masson, Paris.
- Pornon, A., Escaravage, N., TillBottraud, I. & Doche, B. (1997) Variation of reproductive traits in *Rhododendron ferrugineum* L (Ericaceae) populations along a successional gradient. *Plant Ecology*, **130**, 1-11.
- Sargent, R. D. & Ackerly, D. D. (2008) Plant-pollinator interactions and the assembly of plant communities. *Trends in Ecology & Evolution*, **23**, 123-130.
- Webb, C. O., Ackerly, D. D. & Kembel, S. W. (2008) Phylocom: software for the analysis of phylogenetic community structure and trait evolution. *Bioinformatics*, **24**, 2098-2100.
- Webb, C. O., Ackerly, D. D., McPeck, M. A. & Donoghue, M. J. (2002) Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 475-505.
- Webb, C. O., Losos, J. B. & Agrawal, A. A. (2006) Integrating phylogenies into community ecology. *Ecology*, **87**, S1-S2.

ANNEXE 2 : LISTE DES INSECTES PRÉSENTS DANS LES LANDES À *R. FERRUGINEUM*

Les plantes sur lesquelles ont été collectés et/ou observés les insectes sont listées à titre indicatif seulement (liste non exhaustive)

Ordre	Genre / Espèce	Nb d'individus (quand ≤ 5)	Plantes visitées (collectés sur, ou observées sur)
Diptera	<i>Empis (eptempis) pandellei</i> (Daugeron)		<i>Rhododendron ferrugineum</i> <i>Geranium sylvaticum</i> <i>Phyteuma orbiculare</i>
	<i>Empis (Euempis) tessellata</i> (Fabricius)		<i>Rhododendron ferrugineum</i> <i>Polygonum bistorta</i> <i>Thalictrum aquilegifolium</i> <i>Viola cornuta</i>
	<i>Eupeodes bucculatus</i>	1	<i>Rhododendron ferrugineum</i>
	<i>Eupeodes corollae</i>	5	<i>Rhododendron ferrugineum</i> <i>Potentilla erecta</i> <i>Ranunculus acris</i>
	<i>Eupeodes luniger</i>	1	<i>Potentilla erecta</i>
	<i>Chrysotoxum festivum</i>	1	<i>Ranunculus acris</i>
	<i>Merodon flavus</i>	1	<i>Rhododendron ferrugineum</i>
	<i>Platycheirus melanopsis</i>	1	<i>Rhododendron ferrugineum</i>
<i>Scaeva pyrastris</i>	3	<i>Rhododendron ferrugineum</i> <i>Arenaria montana</i>	

			<i>Ranunculus acris</i>
	<i>Scaeva dignota</i>	1	<i>Potentilla erecta</i>
	<i>Scaeva selenitica</i>	3	<i>Hieracium sp.</i> <i>Stellaria holostea</i>
	<i>Sphaerophoria scripta</i>		<i>Rhododendron ferrugineum</i> <i>Potentilla erecta</i> <i>Ranunculus acris</i> <i>Thymus serpyllum</i> <i>Rosa alpine</i> <i>Lotus corniculatus</i> <i>Hieracium sp.</i>
	<i>Eristalis tenax</i>	4	<i>Polygonum bistorta</i> <i>Taraxacum Officinale</i>
	<i>Eristalis jugorum</i>	1	<i>Valeriane officinale</i>
	<i>Volucella Bombylans</i> (L.)		<i>Rhododendron ferrugineum</i> <i>Polygonum bistorta</i> <i>Viola cornuta</i> <i>Geranium sylvaticum</i>
	<i>Cheilosia sp.</i>		<i>Rhododendron ferrugineum</i> + autres non notées
Hymenoptera	<i>Lasioglossum (Evylaeus) albipes</i> (Fabricius)		<i>Rhododendron ferrugineum</i> <i>Ranunculus acris</i> <i>Hieracium sp.</i> <i>Polygonum bistorta</i>
	<i>Lasioglossum (Evylaeus) fratellum</i> (Pérez)	4	<i>Rhododendron ferrugineum</i>

		<i>Ranunculus acris</i> <i>Hieracium sp.</i>
<i>Lasioglossum (Evyllaesus) calceatum</i> (Pérez)	3	<i>Ranunculus acris</i> <i>Geranium sylvaticum</i> <i>Polygonum bistorta</i>
<i>Lasioglossum leucozonium</i> (Schrank)	1	<i>Hieracium sp.</i>
<i>Apis mellifera</i> (L.)		<i>Rhododendron ferrugineum</i> <i>Hieracium sp.</i> <i>Polygonum bistorta</i> <i>Lotus corniculatus</i> <i>Thymus serpyllum</i> <i>Trifolium endressi</i> <i>Saxifraga umbrosa</i> <i>Anthyllis vulneraria</i> <i>Cardamine pratensis</i> <i>Prunella grandiflora</i> <i>Rhinanthus angustifolius</i> <i>Viola cornuta</i> <i>Conopodium majus</i> <i>Potentilla erecta</i>
<i>Formicidae</i> (Famille) Non collecté, non inclus dans les transects d'observation		<i>Rhododendron ferrugineum</i> + autres non notées
<i>Andrena sp.</i>	2	<i>Rosa alpina</i> <i>Taraxacum officinale</i>
<i>Osmia sp.</i>	1	<i>Hieracium sp.</i>
<i>Bombus (Bombus) lucorum</i> (L.)		<i>Rhododendron ferrugineum</i> <i>Chamaespartium sagittale</i> <i>Polygonum bistorta</i>

		<i>Rhinanthus angustifolius</i>
<i>Bombus (Kallobombus) soroensis</i> (Fabricius) <i>ssp. lectitatus</i> (Kruseman)		<i>Rhododendron ferrugineum</i> <i>Polygonum bistorta</i> <i>Trifolium endressi</i> <i>Geranium sylvaticum</i> <i>Phyteuma orbiculare</i> <i>Rosa alpina</i> <i>Rubus idaeus</i> <i>Senecio adonidifolius</i> <i>Anthyllis vulneraria</i> <i>Genista cinerea</i> <i>Lotus corniculatus</i> <i>Potentilla erecta</i>
<i>Bombus (Bombus) terrestris</i> (L.) <i>ssp. lusitanicus</i> (Krüger)	2	<i>Rhododendron ferrugineum</i>
<i>Bombus (Thoracobombus) ruderarius</i> (Müller) <i>ssp. montanus</i> (Lepeletier)		<i>Rhododendron ferrugineum</i> <i>Trifolium endressi</i> <i>Polygonum bistorta</i> <i>Anthyllis vulneraria</i>
<i>Bombus (Alpigenobombus) wurfleini</i> (Radoszkowski) <i>ssp. pyrenaicus</i> (Vogt)		<i>Rhododendron ferrugineum</i> <i>Anthyllis vulneraria</i> <i>Lotus corniculatus</i> <i>Trifolium endressi</i> <i>Vicia sepium</i> <i>Melampyrum pratense</i> <i>Chamaespartium sagittale</i> <i>Rhinanthus angustifolius</i> <i>Phyteuma orbiculare</i> <i>Lathyrus montanus</i> <i>Ajuga reptans</i> <i>Genista cinerea</i>
<i>Bombus (Psithyrus) rupestris</i> (Fabricius) <i>ssp. vasco</i>	4	<i>Rhododendron ferrugineum</i>

(Lepeletier)		
<i>Bombus (Pyrobombus) monticola</i> (Smith) <i>ssp. rondoui</i> (Vogt)	4	Rhododendron ferrugineum <i>Lotus corniculatus</i>
<i>Bombus (Thoracobombus) humilis</i> (Illiger) <i>ssp. quasimuscorum</i> (Vogt)		Rhododendron ferrugineum <i>Polygonum bistorta</i> <i>Chamaespartium sagittale</i>
<i>Bombus (Thoracobombus) pascuorum</i> (Scopoli) <i>ssp. maculatus</i> (Vogt)		Rhododendron ferrugineum <i>Polygonum bistorta</i> <i>Chamaespartium sagittale</i>
<i>Bombus (Rhodobombus) mesomelas</i> (Gerstaecker)		Rhododendron ferrugineum <i>Anthyllis vulneraria</i> <i>Lathyrus montanus</i> <i>Lotus corniculatus</i> <i>Trifolium endressi</i> <i>Chamaespartium sagittale</i> <i>Trifolium repens</i> <i>Thymus serpyllum</i>
<i>Bombus (Thoracobombus) sylvarum</i> (L.)	2	Rhododendron ferrugineum
<i>Bombus (Confusibombus) confusus</i> (Schenck)	3	Rhododendron ferrugineum
<i>Bombus (Thoracobombus) ruderarius</i> (Müller) <i>ssp. ruderarius</i> (Lepeletier)		Rhododendron ferrugineum <i>Trifolium endressi</i> Hypocrepis comosa
<i>Bombus (Melanobombus) lapidarius</i> (L.)		Rhododendron ferrugineum <i>Trifolium endressi</i> <i>Genista repens</i> <i>Lotus corniculatus</i> <i>Melampyrum pratense</i> <i>Hypocrepis comosa</i>

	<i>Bombus (Ashtonipsityrus) bohemicus</i> (Seidl)	<i>Rhododendron ferrugineum</i>
	<i>Bombus (Pyrobombus) pratorum</i> (L.) <i>santonae</i> (Tkalcu)	<i>Rhododendron ferrugineum</i> <i>Genista repens</i>
Lepidoptera	<i>Aglais urticae</i> (L.) <i>Inachis io</i> (L.) <i>Macroglossum stellatarum</i> (L.)	<i>Rhododendron ferrugineum</i> + autres non notées

ANNEXE 3 : LISTE DES METHODES UTILISEES ET DES VARIABLES ESTIMEES AU COURS DE LA THESE

MÉTHODES	ECHELLE DE L'ÉCHANTILLONNAGE / EXPÉRIMENTATION	ANNÉE(S)	VARIABLES ESTIMÉES	CHAPITRES CORRESPONDANTS ²³
Relevés des visites le long de transects d'observations	Patch (<i>R. ferrugineum</i> et communauté environnante)	2009 et 2010	Diversité et abondance des insectes visiteurs des fleurs Nombre et identité des espèces de plantes visitées	1 (2009) et 2 (2010) Non publié
Capture-marquage-recapture (<i>Bombus spp.</i>)	Patch - sous échantillon (<i>R. ferrugineum</i> et communauté environnante)	2010	Nombre et identité des plantes visitées Distance de déplacement à l'échelle de l'individu	Non publié Non publié
Analyse des charges polliniques corporelles (<i>Bombus spp.</i> et <i>Empis sp.</i>)	Patch (<i>R. ferrugineum</i> et communauté environnante)	2010	Quantité relative de pollen de <i>R. ferrugineum</i> vs. communauté environnante transportée par chaque insecte	2 et Annexe 1
Relevés des visites à <i>R. ferrugineum</i> / individu / 10min	Individus (<i>R. ferrugineum</i>)	2009	Taux de visites / fleur	1 et 4
Emasculatation des fleurs, analyse des charges polliniques stigmatiques	Individus (2 stigmates / individu)	2010	Quantité relative de pollen de <i>R. ferrugineum</i> vs. communauté environnante déposée par les pollinisateurs (auto-pollen exclu)	2

²³ Voir sommaire partie 2

Analyse des charges polliniques stigmatiques (fleurs intactes)	Individus (2 stigmates / individu)	2010	Quantité relative de pollen de <i>R. ferrugineum</i> vs. communauté environnante déposée par les pollinisateurs	2
Comptage fruits viables par inflorescence (intacte)	Individus (2 inflorescences / individu)	2009	Proportion de fruits viables produit par inflorescence	5
Comptage graines viables par fruit pour 6 traitements	Individus (4 fruits / traitement / individu)	2009	Production de graines viables par fruit	
1) Fleurs intactes			<u>Calcul de paramètres de pollinisation</u>	
2) Fleurs intactes + pollinisation manuelle avec de l'allopollen			∶	1, 4
3) Fleurs émasculées			Transfert de pollen (trait 2 vs trait 3)	4
4) Fleurs intactes ensachées			Autofertilité (4 vs 2)	4
5) Fleurs intactes ensachées + pollinisation manuelle avec de l'autopollen			Limitation en pollen (1 vs 2)	4,5
6) <i>Fleurs émasculées + ensachées + pollinisation manuelle avec de l'allopollen (non utilisé)</i>			Assurance reproductive (1 vs 3)	5
			Autocompatibilité (5 vs 2)	
Mesures des traits floraux sur fleurs intactes	Individus (2 fleurs / individu)	2009	Herzogamie, taille fleurs (longueur, diamètre)	4
Récolte de bourgeons inflorescentiels, comptage pollen et ovules par fleur	Individus (4 fleurs / individu)	2009	Traits floraux (ratios P/O)	5
Pyrosequencage	Mélange d'ADN de plusieurs individus	2009	Développement de marqueurs microsatellites	3

Analyse génétique des descendants (1001) et des plantes mères (106)	Individus (<i>R. ferrugineum</i>)	2009	Système de reproduction (taux d'allofecondation multilocus, corrélation de paternité)	4 et 5
Analyse génétique d'individus matures (600; 20/patch maximum)	Patch (<i>R. ferrugineum</i>)	2009	Diversité génétique intra et inter patch	Non publié

TITLE: Plant-pollinator interactions and mating system in fragmented habitat : The case study of a mass-flowering shrub

ABSTRACT: There is increasing evidence that global changes negatively impact plant and pollinator populations. However, the ecological and evolutionary consequences of pollinator and mate limitations on plant mating system have been poorly studied. To contribute to this scientific challenge, we study the importance of pollination failure in a self-compatible and mass-flowering shrub (*Rhododendron ferrugineum*) along a gradient of floral display size. To explore the causes of pollination failure and the consequences on the reproductive success of this focal species, we used an integrative approach including: the study of plant-pollinator interactions at the community scale, pollinator and stigmatic pollen load analyses and the pollination and mating system of the focal species. We also examine, at the species and community levels, the ecological and evolutionary processes that might be able to alleviate pollination failure. We evidence that pollinator abundance substantially decreased with decreasing *R. ferrugineum* floral display size. Nevertheless, this highly attractive species monopolizes pollinators from the surrounding community, mitigating the negative consequences of plant isolation. Pollination failure, assessed by pollen transfer limitation in *R. ferrugineum*, is due to low pollinator availability in patches with large floral display sizes (intraspecific competition) while it is due to low conspecific plant availability in patches with small floral display sizes. Our study highlights that pollinator versus mate limitation resulted in contrasted pollination modes (allogamy / facilitated autogamy, respectively), reproductive success (low / high) and selfing rate (low / high). Contrary to our expectations, no evolutionary shift has been observed towards a higher frequency of spontaneous self-fertilization in response to pollen transfer limitation due to either pollinator or mate limitation. This study clearly demonstrates the relevance of using holistic approaches to assess global changes consequences on mating system evolution and adaptive potential of plant species. High inbreeding depression and selective pressures on pollinator attractive structures, allowing both facilitated selfing and outcrossing, are likely to prevent mating system evolution in long-lived mass-flowering species.

KEY WORDS: community, fragmentation, inbreeding depression, mating system evolution, plant-pollinator interactions, pollen limitation, reproductive assurance, selfing.

AUTEUR : Chloé Delmas

TITRE : Interactions plantes-pollinisateurs et reproduction sexuée en habitat fragmenté : Le cas d'un arbuste à floraison massive

DIRECTEURS DE THÈSE : Dr André Pornon et Dr Nathalie Escaravage

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Salle de conférence - IBCG - Campus UPS - Lundi 16 janvier 2012 à 14h

RESUMÉ : Il est maintenant reconnu que les changements globaux actuels ont un impact négatif sur les populations de plantes et de pollinisateurs. Pourtant, les conséquences écologiques et évolutives d'une limitation en partenaires sexuels et/ou en pollinisateurs sur les systèmes de reproduction des plantes ont été peu étudiées à ce jour. Notre contribution à cet enjeu scientifique porte ainsi sur l'étude de la limitation de la pollinisation le long d'un gradient de ressources florales chez un arbuste autocompatible à floraison massive (*Rhododendron ferrugineum*). Les causes de cette limitation et ses conséquences sur la reproduction sexuée du rhododendron y sont explorées au moyen d'une approche multiple comprenant : la description des interactions plantes-pollinisateurs à l'échelle de la communauté, l'étude des charges polliniques transportées et déposées par les pollinisateurs et la caractérisation de la pollinisation et du système de reproduction de *R. ferrugineum*. Les mécanismes écologiques et évolutifs (intrinsèques à cette espèce ou liés à la communauté environnante de plantes) susceptibles de compenser la limitation de la pollinisation sont également examinés. Nous mettons en évidence que l'abondance des pollinisateurs diminue substantiellement avec la réduction des ressources florales de *R. ferrugineum*. Toutefois, grâce à sa forte attractivité, ce dernier monopolise les pollinisateurs de la communauté compensant ainsi l'effet négatif de l'isolement. La limitation de la pollinisation (transfert de pollen) de *R. ferrugineum*, est principalement due à une faible disponibilité en pollinisateurs lorsque les ressources florales sont abondantes (compétition intraspécifique) et à une faible disponibilité en partenaires sexuels lorsque les ressources florales sont réduites (autre extrémité du gradient). Notre étude démontre que la limitation en pollinisateurs et la limitation en partenaires conduisent à deux modes de pollinisation contrastés (respectivement allogamie / autogamie facilitée) et à une variation du succès reproducteur (faible / élevé) et du taux d'autofécondation (faible / élevé) de *R. ferrugineum*. Toutefois, aucun changement évolutif du système de reproduction vers l'autofécondation spontanée n'a été observé en réponse à cette limitation en transfert de pollen, quelle que soit son origine (pollinisateurs / partenaires). Cette étude démontre clairement l'intérêt d'utiliser une approche holistique pour étudier les conséquences des changements globaux sur l'évolution du système de reproduction et le potentiel adaptatif des plantes. La très forte dépression de consanguinité et les pressions de sélection liées à l'attraction des pollinisateurs favorisant tant l'autogamie facilitée que l'allogamie, semblent fortement contraindre l'évolution du système de reproduction des espèces pérennes à floraison massive.

MOTS CLÉS : autofécondation, assurance de reproduction, communauté, dépression de consanguinité, évolution des systèmes de reproduction, fragmentation, interactions plantes-pollinisateurs, limitation en pollen.

DISCIPLINE : Écologie, Biodiversité et Évolution

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE : Laboratoire EDB (Évolution et Diversité Biologique), UMR 5174 CNRS/UPS, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France.