

N° attribué par la bibliothèque :

.....

THESE

présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Lille I

Spécialité : Biologie et Génétique des Populations

Formation doctorale : Evolution et Ecologie

Evolution et maintien de l'androdioécie

Etude théorique et approches expérimentales chez *Phillyrea angustifolia* L.

par

Christine VASSILIADIS



Soutenue le 16 décembre 1999 devant le jury composé de :

Mme Deborah CHARLESWORTH, Professeur, Université Edinburgh
M. Xavier VEKEMANS, Chargé de cours, Université Libre de Bruxelles
M. Jacques LEPART, IR CNRS, CEFE, Montpellier
M. Bernard GODELLE, Professeur, Université Montpellier II
M. Pierre SAUMITOU-LAPRADE, CR CNRS, Université Lille1
M. Philippe VERNET, Professeur, Université Lille1

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse n'est pas due à mon seul travail, et je voudrais ici remercier de tout cœur tous ceux qui m'ont aidée à la mener à terme, et ceux qui m'ont supportée (dans tous les sens du terme) durant les moments difficiles (et heureux) de ces quatre dernières années. C'est à eux tous que je dédie ce travail. Difficile de n'oublier personne entre mes séjours successifs à Montpellier, Paris et Lille...

Merci donc à :

Louis Thaler pour m'avoir accueillie dans son DEA à Montpellier,

Jacques Lepart, pour son soutien, sa gentillesse et toute son aide, de près ou de loin,

Pierre Saumitou-Laprade, pour son soutien sans réserve, et dont la patience me fait penser qu'il est décidément un saint homme et mérite une médaille,

Philippe Vernet, pour m'avoir accueillie au sein du GEPV, et apporté son soutien aux moments décisifs, et Myriam Valero, nouvelle directrice du labo, qui a su aussi me soutenir et me conseiller,

Bernard Godelle, qui m'a guidée dans les développements mathématiques d'une idée et pour la grande satisfaction intellectuelle (et aussi gastronomique) qu'il m'a apportée,

Xavier Vekemans et Deborah Charlesworth, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Merci à Myriam et Christophe, Joël et Juliette, Pierre et Monika, et Carolyn et Daniel pour leur chaleureuse hospitalité,

Merci à tous les membres du GEPV, membres dits 'permanents' (chercheurs, enseignants, et personnel technique et administratif), dont les compétences multiples et les qualités humaines certaines rendent la vie de thésard un peu plus supportable.

Merci aux étudiants, Benoît, Valérie B, Eric, au cœur du collectif étudiant avec Valérie L et Yves, Carolyn, stagiaires et autres 'non-permanents' de passage au labo, que je ne nommerai pas tous ici, mais ils savent combien ils m'ont apporté.

Merci à tous mes gentils stagiaires et à leurs petites mains bien utiles : Christelle et Marie, Carole et Séverine, Magali et Gaël, et Guillaume, mon « fidèle serviteur » jusqu'à la dernière heure.

Merci à tous les membres du CEFÉ, du troisième étage et aussi du deuxième, en particulier John Thompson, pour ses encouragements et son soutien, et aussi José Escarré, Chantal Debain et Christian Collin ; merci également à Bertrand Dommée.

Merci à Pierre-Henri Gouyon, parce que c'est grâce à lui, à ses cours, puis à son accueil dans son labo en 1995 que j'ai poursuivi dans cette voie, et puis pour m'avoir à nouveau accueillie et encouragée pendant ma thèse ; merci à Jacqui Shykoff et à tous les étudiants (en particulier Frédéric et Jean-Baptiste) et permanents du laboratoire Evolution et Systématique d'Orsay qui ont rendu mon séjour si sympathique.

Grand merci à ceux qui, grâce à leur gentillesse, leur patience et leur efficacité à toute épreuve, rendirent l'accouchement de cette thèse moins douloureux, en particulier Pierre, Myriam, Fred, Carolyn, Karine, et mes parents. Ils savent combien je leur dois.

Merci à Irène Till-Bottraud et Agnès Mignot, mes premières maîtresses de stage qui m'ont donné goût les premières aux histoires de pollen.

Merci à tous mes amis qui de près ou de (très) loin ont su me témoigner leur appui : Assia, Jean-Rémi, Marianne, Carolyn et Daniel, Michèle T, Tean, Myriam J et

Cheikh, Anne C, Philippe M, Latifa, Florent, Marsu, Enrique, Magali S; et aussi Joël B et MH pour m'avoir gentiment hébergée lors de mes séjours parisiens.

Et puis je remercie également toute ma famille: mon père, pour son soutien logistique et moral; ma mère pour ses sorties culturelles, Anne, ma sœur Anne, Alban et leurs enfants nés pendant cette thèse, Philippe et Anne-Claire, François et Carmen, et toute la famille de Carmen pour leur accueil; ma tante Annie de Suède, et ma tante Betty de Grèce pour leurs accueils chaleureux, mes cousins et cousines (en particulier Danaé) ; ainsi qu'un certain Espagnol.

Préambule

Je voudrais préciser ici la structure de cette thèse, afin que le lecteur s'y retrouve.

L'introduction bibliographique replace l'androdioécie dans son contexte théorique et biologique.

Le chapitre 1 concerne les études antérieures réalisées sur *Phillyrea angustifolia*..

J'ai choisi d'intégrer les articles écrits au cours de cette thèse au sein du document (sauf l'article concernant la mise au point des marqueurs microsatellites, qui constitue l'annexe3), afin que la logique de l'ensemble soit respectée. Les deux articles constituant les chapitres 2 et 4 respectivement sont précédés d'une introduction en français.

Le chapitre 3 est rédigé entièrement en français, en suivant la structure d'un futur article ; cependant, les analyses ne sont pas entièrement achevées.

Table des matières

INTRODUCTION	7
LES SYSTÈMES DE REPRODUCTION CHEZ LES ANGIOSPERMES	9
<i>L'évitement de l'autofécondation</i>	9
<i>La réallocation des ressources</i>	10
<i>Le déterminisme du sexe</i>	11
L'ANDRODIOÉCIE, SYMÉTRIQUE DE LA GYNODIOÉCIE: CONTRAINTES THÉORIQUES.....	13
<i>Modèles génétiques à déterminisme nucléo-cytoplasmique du sexe (voir encadré i.3)</i> ...	13
<i>Modèles phénotypiques (voir encadré i.4)</i>	14
STABILITÉ COMPARÉE DE LA GYNODIOÉCIE ET DE L'ANDRODIOÉCIE.....	15
<i>La gynodioécie, système stable ou transitoire</i>	15
<i>L'androdioécie, système stable ou transitoire ?</i>	16
CHAPITRE 1. PHILLYREA ANGUSTIFOLIA, UNE ESPÈCE ANDRODIOÏQUE ?	20
GÉNÉRALITÉS SUR PHILLYREA ANGUSTIFOLIA.....	20
<i>Position systématique au sein des Oléacées</i>	20
<i>Le genre Phillyrea</i>	21
<i>Ecologie et répartition géographique</i>	22
<i>Biologie de l'espèce</i>	23
L'ANDRODIOÉCIE CHEZ PHILLYREA ANGUSTIFOLIA.....	24
<i>La stérilité femelle et sa stabilité</i>	24
<i>Les fréquences de stérilité femelle en populations</i>	24
<i>L'hérédité du sexe</i>	26
LES OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	28
CHAPITRE 2. AUTO-INCOMPATIBILITÉ ET SUCCÈS REPRODUCTEUR MÂLE CHEZ PHILLYREA ANGUSTIFOLIA (OLEACEAE)	29
CHAPITRE 3. L'ESTIMATION DU SUCCÈS REPRODUCTEUR MÂLE PAR ANALYSE DE PATERNITÉ EN POPULATION NATURELLE	62
GÉNÉRALITÉS SUR LES ANALYSES DE PATERNITÉ	62
<i>Méthode d'exclusion</i>	63
<i>Le mâle le plus vraisemblable ('most-likely')</i>	64
<i>Attribution fractionnelle de paternité</i>	66
ANALYSE DE PATERNITÉ CHEZ PHILLYREA ANGUSTIFOLIA	67
<i>Introduction</i>	67
<i>Matériel et méthodes</i>	68
<i>Méthode d'analyse des descendance</i> s.....	71
<i>Résultats - discussion</i>	71
<i>Conclusions</i>	81
CHAPITRE 4. MODÉLISATION DE L'ÉVOLUTION DE LA STÉRILITÉ FEMELLE LIÉE À L'INCOMPATIBILITÉ	83
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	114
BIBLIOGRAPHIE	117
ANNEXES	127
ANNEXE 1. TABLEAU DES CARACTÉRISTIQUES DES ESPÈCES ANDRODIOÏQUES.....	127
ANNEXE 2. PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN.....	141
ANNEXE 3. PRIMER NOTE. LOCUS MICROSATELLITES CHEZ <i>P. ANGUSTIFOLIA</i>	142

Introduction

Introduction

La diversité du monde vivant s'observe à tous les niveaux, des molécules aux écosystèmes; l'apparition et le maintien d'une telle diversité fait l'objet d'études en biologie évolutive. L'un des sujets d'étude les plus importants est la diversité des systèmes de reproduction¹, particulièrement élevée chez les végétaux, et à laquelle Darwin avait consacré une partie de son travail (Darwin 1877). L'étude de la signification évolutive de la reproduction sexuée a fait depuis l'objet de nombreuses études et de synthèses (Williams 1975; Maynard Smith 1978; Stearns 1987; Michod & Levin 1988). Cet attrait s'explique par plusieurs raisons. Tout d'abord, la valeur sélective correspond au succès reproducteur qui est évidemment étroitement lié au système de reproduction. Le système de reproduction est ainsi lui-même l'un des facteurs d'évolution des caractères d'une espèce, puisqu'il conditionne l'ampleur et la structuration de la diversité génétique de l'espèce, et donc ses potentialités d'adaptation et de maintien. Ensuite, la diversité des systèmes de reproduction concerne l'ensemble des espèces. De plus, certaines espèces présentent une diversité au niveau intra-spécifique, le maintien des différents phénotypes et leurs fréquences relatives faisant appel à divers mécanismes écologiques et génétiques.

Les systèmes de reproduction se divisent en deux grands groupes : reproduction asexuée et reproduction sexuée. La reproduction asexuée ou clonale ne fait que reproduire de l'identique aux mutations près, alors que la reproduction sexuée permet un brassage de gènes d'une génération à l'autre, par le biais des brassages génétiques inter- et intra-chromosomiques ayant lieu pendant la méiose. Par reproduction asexuée, un seul parent transmet la totalité de son génome à son descendant. En revanche, chaque individu issu de reproduction sexuée est le produit de la fusion de deux gamètes, de tailles différentes (cas de l'anisogamie). Les gamètes mâles sont petits et nombreux, souvent mobiles et les gamètes femelles sont plus gros, moins nombreux et souvent immobiles. Ils peuvent être produits au sein d'un même individu (monoécie, ou hermaphrodisme), ou séparément chez des individus différents (dioécie, ou gonochorisme chez les animaux). Deux parents sont nécessaires, et chaque parent ne transmet donc que la moitié de son patrimoine génétique à son descendant. A nombre égal de descendants, une femelle transmet donc deux fois moins bien son génome nucléaire par reproduction sexuée que par reproduction asexuée, ce qui confère un désavantage à court

¹ Le terme 'système de reproduction' traduit deux expressions en anglais: 'mating system', terme plutôt employé pour décrire si les individus se reproduisent par autofécondation ou allofécondation, et 'breeding system', terme général qui décrit la répartition des phénotypes sexuels (un seul, plusieurs, etc..) et aussi l'autofécondation. C'est dans ce sens général que nous l'employons ici.

terme à la reproduction sexuée : il s'agit du coût à la production de mâles (Maynard Smith 1971), ou coût de la méiose (Williams 1975; Uyenoyama 1984). Malgré ce fort désavantage à court terme, la reproduction sexuée est paradoxalement largement répandue (Maynard Smith 1971; Williams 1975). Les explications du maintien du sexe sont de deux ordres : à court terme (contraintes de développement, physiologiques ou génétiques), et à long terme : les lignées asexuées disparaissent plus rapidement que les lignées sexuées faute de brassage génétique, qui permet l'association de mutations favorables et la mise sous silence de mutations délétères (avantage de la recombinaison, (Muller 1932)).

Une façon d'aborder ce problème est l'étude de l'évolution et du maintien des nombreux systèmes de reproduction qui peuvent coexister à l'intérieur d'une même famille (par ex. les Labiées, avec des espèces hermaphrodites et gynodioïques) ou d'un même genre (par exemple, *Silene* avec des espèces dioïques et hermaphrodites (Desfeux 1996)), ou au sein d'une même espèce (par exemple *Beta vulgaris* ssp. *maritima* avec des populations gynodioïques et hermaphrodites; Cuguen *et al.* 1994).

Cette thèse s'inscrit dans une longue lignée de thèses portant sur la gynodioécie (coexistence de femelles et d'hermaphrodites au sein d'une population), mais en abordant cette fois le cas symétrique de l'androdioécie (coexistence de mâles et d'hermaphrodites au sein d'une population), et chez une espèce peu étudiée jusque-là, *Phillyrea angustifolia*.

Je présenterai d'abord les systèmes de reproduction chez les Angiospermes, et leur étude évolutive, notamment en comparant les modèles de l'évolution et du maintien des deux systèmes mixtes androdioïque et gynodioïque. Bien que symétriques, ces deux systèmes de reproduction ont des contraintes évolutives différentes. Enfin, je décrirai les espèces androdioïques existantes en distinguant les espèces fonctionnellement dioïques de celles fonctionnellement androdioïques.

Dans le chapitre 1, je présenterai en détail l'espèce étudiée, *Phillyrea angustifolia*, et exposerai les questions relatives à l'existence d'une androdioécie fonctionnelle chez cette espèce.

Dans les chapitres 2 et 3, je présenterai les principaux résultats expérimentaux de ma thèse. Le chapitre 2 concerne l'estimation du succès reproducteur mâle et de l'autoincompatibilité chez *Phillyrea angustifolia* par des expériences de pollinisations contrôlées (article accepté dans International Journal of Plant Sciences). Il montre que les hermaphrodites sont bien potentiellement mâle-fertiles chez cette espèce. Le chapitre 3 aborde la question du succès reproducteur mâle en populations naturelles. La première partie de ce chapitre est consacrée aux analyses de paternité, la deuxième partie à la mise au point de marqueurs microsatellites chez cette espèce (article sous presse dans Molecular Ecology), et la troisième partie à

Encadré i.1. Différents systèmes de reproduction sexuée chez les Angiospermes d'après (Richards 1997)

Une fleur est considérée comme hermaphrodite si elle porte un androcée (étamines) contenant les grains de pollen ou microspores, futurs gamétophytes mâles (haploïdes), et un gynécée (pistil), qui comprend le stigmate, le style et l'ovaire contenant les ovules. Chaque ovule fertile contient un sac embryonnaire ou gamétophyte femelle, chacun avec un oosphère ou gamète femelle.

Un individu, dont le phénotype sexuel est donné entre crochets ci-dessous, peut porter des fleurs toutes hermaphrodites (c'est le cas le plus fréquent), uniquement mâles, femelles, ou bien à la fois des fleurs mâles et hermaphrodites, ou femelles et hermaphrodites, ou mâles et femelles.

Le système de reproduction concerne une population d'individus, et plus généralement une espèce (mais les proportions des différents phénotypes sexuels peuvent varier entre populations au sein de l'espèce). Les différents systèmes de reproduction des Angiospermes sont présentés ci-dessous, avec la proportion d'espèces concernées, en distinguant les systèmes où un seul phénotype sexuel est présent, des systèmes où deux (bisexués) ou plus de deux phénotypes sexuels sont présents dans la population.

Un seul phénotype sexuel		% d'espèces	Deux phénotypes sexuels ou plus		% d'espèces
Hermaphrodisme	[♂]	72	Dioécie	[♀] [♂]	4
Gynomonoécie	[♀]	2.8	Gynodioécie	[♂] [♀]	7
Andromonoécie	[♂]	1.7	Androdioécie	[♀] [♂]	rare
Monoécie	[♂]	5	Subgynodioécie	[♂] [♀]	2?
			Subandrodioécie	[♂] [♂]	2
			Polygamie	[♂] [♂] [♀] [♀] [♀]	3.6

l'estimation du succès reproducteur mâle et des flux de gènes au sein d'une petite population naturelle effectuée par analyse de paternité à l'aide de ces marqueurs hypervariables.

Finalement, dans le chapitre 4, au vu des résultats paradoxaux obtenus chez *P. angustifolia* par rapport aux attendus des modèles classiques, j'aborderai des travaux de modélisation sur le maintien de l'androdioécie, sous l'hypothèse d'un lien génétique entre stérilité femelle et incompatibilité (article soumis à Heredity).

Les systèmes de reproduction chez les Angiospermes

La diversité des systèmes de reproduction observés chez les plantes a depuis longtemps fasciné les biologistes (Darwin 1877; Bawa & Beach 1981; Richards 1997). L'encadré i.1 présente les différents systèmes de reproduction rencontrés chez les Angiospermes (Richards 1997) qui découlent de la coexistence de un ou plusieurs phénotypes sexuels. La majorité des espèces (72%) sont hermaphrodites (les sexes mâle et femelle sont présents sur la même fleur), une minorité (4%) sont dioïques (individus mâles et individus femelles). Des taux élevés d'espèces dioïques sont trouvés localement sur des îles (28% à Hawaï, 13% en Nouvelle-Zélande), et chez arbres tropicaux (par ex. 23% dans une station de Costa Rica (Bawa *et al.* 1985). Entre ces deux systèmes, tous les intermédiaires existent (encadré i.1): présence de fleurs unisexuées et hermaphrodites au sein d'un individu (andromonoécie, gynomonoécie), et présence d'individus unisexués coexistant avec des hermaphrodites (androdioécie, gynodioécie).

Il semble très probable que chez les Angiospermes la forme ancestrale soit l'hermaphroditisme (Taktajhan 1969). A l'appui de cette thèse, trois arguments sont avancés. D'une part, il s'agit du système le plus répandu aujourd'hui, même dans les groupes les plus dérivés de leur fondateur. Les autres systèmes sont rarement prédominants dans une famille ou un ordre, ce qui suggère leur origine relativement plus récente, et/ou une plus grande instabilité. D'autre part, l'observation d'organes sexuels vestigiaux dans les fleurs unisexuées indique clairement leur origine hermaphrodite (Arroyo & Raven 1975; Webb 1979; Delph 1990a). Enfin, des études phylogénétiques plus récentes sont plutôt en faveur d'un caractère ancestral hermaphrodite (Donoghue 1989; Sytsma *et al.* 1991; Graham & Barrett 1995; Weller *et al.* 1995). Cependant, ces données ne sont pas univoques (Desfeux 1996).

Le passage de la cosexualité à la séparation des sexes est expliquée généralement par deux facteurs principaux, l'évitement de l'autofécondation et la réallocation des ressources.

L'évitement de l'autofécondation

Chez la plupart des Angiospermes, la présence des sexes mâle et femelle sur le même individu (hermaphroditisme, monoécie) rend l'autofécondation théoriquement possible. Un

Encadré i.2. La valeur sélective d'un individu: définition et problème de mesure

La valeur sélective (ou "fitness") est l'un des concepts majeurs en biologie évolutive (Beatty 1992; Paul 1992). Après sa définition, nous aborderons les différents aspects de sa mesure, dans le cas d'une plante hermaphrodite.

1. Définition

Darwin n'a pas utilisé directement le terme de 'fitness' mais son concept avec ses deux aspects: survie et fertilité "*I use the term Struggle for the Existence in a large and metaphorical sense, including dependence of one being on another, and including (which is more important) not only the life of the individual, but success in leaving progeny*"¹ (Darwin 1859).

La valeur sélective absolue d'un génotype (ou individu) donné, dans un environnement donné, physique (sol, climat) et biotique (compétition intra- et inter-spécifique, des relations de parasitisme et de prédation), est le produit de la **probabilité de survie** (jusqu'à l'âge de reproduction) de ce génotype par le **nombre de ses descendants attendus** (ou moyen), s'il survit (définition de Maynard Smith 1989, p. 37-38).

Elle a d'abord été définie comme la contribution effective à la descendance; mais afin de tenir compte des effets du hasard, elle fut ensuite définie comme le nombre moyen de descendants d'un type d'organisme (dans un environnement donné); et finalement comme la capacité générale (due à toute une série de traits physiologiques et anatomiques) de laisser des descendants dans un environnement particulier.

2. Mesure de la valeur sélective (Niklas, 1997, p.19-21).

2.1. Survie

La survie comprend différentes composantes; elle peut être estimée par la viabilité relative ou survie différentielle des plantules jusqu'à l'âge de reproduction, la vitesse de développement des plantules; et la longévité des individus adultes (surtout pour les plantes pérennes). Ce dernier paramètre est difficilement mesurable.

2.2 Fertilité

Dans le cas d'une plante hermaphrodite, elle concerne les fonctions mâle et femelle. Le terme de fertilité ('fertility' en anglais) est ambigu, car il peut désigner soit la **fertilité potentielle** d'un individu (production de gamètes viables et *potentiellement* féconds, ovules et/ou pollen), soit sa **fertilité réalisée** ou **fécondité** (production de descendants par voie femelle et/ou par voie mâle).

¹ "(...) j'emploie le terme de *lutte pour l'existence* dans le sens général et métaphorique, ce qui implique les relations mutuelles de dépendance des êtres organisés, et, ce qui est plus important, non seulement la vie de l'individu, mais son aptitude ou sa réussite à laisser des descendants." (trad. Daniel Becquemont, GF).

descendant issu d'autofécondation possède deux copies du génome de la mère, alors que le descendant issu d'allofécondation ne possède qu'une copie du génome de la mère, et une copie issue du pollen du père. L'autofécondation confère un avantage génétique double évident sur l'allofécondation (Fisher 1941). De plus, en situation de pollen limitant (par exemple dans le cas de populations à faible densité, ou en situation de colonisation), l'autofécondation permet d'assurer la reproduction (cas des plantes annuelles autogames, (Baker 1955)). A cet avantage s'oppose la dépression de consanguinité. L'autofécondation implique la mise sous forme homozygote de nombreux allèles délétères présents dans le génome (fardeau génétique) (Crow & Kimura 1963). C'est pourquoi chez les espèces allogames, les descendants issus d'autofécondation ont très généralement une moins bonne valeur sélective par rapport à ceux issus d'allofécondation. La différence de valeur sélective relative est appelée dépression de consanguinité.

Du fait de la dépression de consanguinité, le rôle de l'évitement de l'autofécondation est l'une des forces majeures d'évolution des systèmes de reproduction. Si la majorité des espèces sont hermaphrodites, et donc potentiellement autofécondes, la cosexualité n'est pas toujours liée à l'autogamie. En effet, différents mécanismes limitent l'autofécondation au sein d'une même fleur hermaphrodite ou entre fleurs d'un même individu (geitonogamie) (Bawa & Beach 1981): (1) un décalage temporel des fonctions mâle et femelle (dichogamie): la déhiscence des anthères précède la réceptivité du stigmate (protandrie) ou l'inverse (protogynie); (2) une séparation spatiale des anthères et des stigmates (herkogamie); (3) l'auto-incompatibilité: mécanisme physiologique empêchant la germination ou la croissance de l'autopollen (système gamétophytique, sporophytique, hétérostylie où la taille du style et des étamines varie entre individus; la fécondation ne peut avoir lieu qu'entre morphes différents).

La séparation des sexes au sein d'un même individu (monoécie) et surtout entre individus (en particulier si les fonctions mâle et femelle sont complètement séparées, cas de la dioécie) sont d'autres moyens pour favoriser l'allogamie.

La réallocation des ressources

Une plante dispose de ressources limitées, qu'elle peut allouer à sa croissance, sa survie ou sa reproduction, asexuée ou sexuée. La notion d'allocation des ressources est liée au 'trade-off' anglais (loi de compensation de Darwin). La stratégie d'allocation de ressources d'une plante détermine son phénotype sexuel; elle est soumise à différentes pressions de sélection qui ont pour conséquence la production d'une seule fonction (mâle ou femelle), ou des deux fonctions ainsi que la part allouée à chacune (Charnov *et al.* 1976). Dans son allocation à la reproduction sexuée, la plante peut favoriser la fonction mâle ou la fonction femelle, ce qui correspond à sa valeur sélective mâle ou femelle (voir encadré i.2: fertilité potentielle et

Encadré i.2 (suite)

2.2.1 Mesure de la fertilité potentielle (pré-zygotique)

femelle (rarement effectuée dans la littérature): La mesure de la fertilité femelle en terme d'ovules viables peut être obtenue à l'aide de colorant de viabilité.

mâle (plus fréquemment effectuée dans la littérature):

- quantité et qualité du pollen produit (germinabilité *in vitro*; coloration);
- efficacité de sa dispersion (disposition des étamines ou des fleurs).

Ces deux premières estimations correspondent à la fertilité mâle (utilisée dans les modèles) et concernent la phase de pollinisation. Un troisième paramètre concerne la phase post-pollinisation, pré-zygotique:

- compatibilité²: le nombre de croisements potentiellement compatibles dans une population donnée (Vekemans *et al.* 1998).

2.2.2 Mesure de fertilité réalisée, ou fécondité, ou succès reproducteur (post-zygotique)

femelle (plus fréquemment effectuée dans la littérature): Jusqu'à un passé récent, les biologistes n'avaient accès qu'à la fécondité femelle, facile à mesurer, car il suffit de compter le nombre de graines par individu. Cette mesure a souvent servi d'estimation pour la valeur sélective reproductrice totale d'un individu hermaphrodite.

- nombre d'ovules fécondés, s'il n'y a pas d'autofécondation des hermaphrodites.
- qualité des ovules fécondés, s'il y a autofécondation partielle : dans ce cas, les ovules autofécondés peuvent être moins bons à cause de la dépression de consanguinité.

Dans les modèles, c'est ce qui est appelé 'avantage femelle en fertilité' (des femelles par rapport aux hermaphrodites).

mâle (encore rarement effectuée dans la littérature): La mesure de la fécondité mâle, ou nombre de descendants effectivement produits par le pollen d'un individu donné sur différents individus 'receveurs' (mères des descendants), est devenue accessible grâce aux analyses de paternité par l'utilisation de marqueurs génétiques (enzymatiques, RFLPs, microsatellites; voir chapitre 3; Bertin 1988; Snow & Lewis 1993).

² Chez *Eulimnadia texana*, et chez *Caenorhabditis elegans*, deux espèces androdioïques, les hermaphrodites sont incapables de se croiser entre eux; mais seulement de s'autoféconder. Seuls les mâles participent à la fécondation croisée, et l'avantage en fertilité requis pour leur maintien en population peut être inférieur à deux (Otto *et al.* 1993).

réalisée). Charnov a montré que, quel que soit le système de reproduction (hermaphrodisme, monoécie, dioécie), les allocations mâle et femelle doivent être équivalentes, chez les allogames. Les autogames, au contraire, vont avoir tendance à allouer moins à la fonction mâle.

Les aspects théoriques de l'évolution de l'hermaphrodisme à la dioécie via des systèmes intermédiaires comme la gynodioécie ou l'androdioécie ont été développés (Lewis 1942; Charlesworth & Charlesworth 1978; Bawa 1980; Ross 1981; Charlesworth 1984). A la suite d'une mutation qui confère la stérilité mâle (ou femelle), un hermaphrodite devient unisexué. Par réallocation de ses ressources, la plante mâle stérile (ou femelle stérile) acquiert ainsi un avantage femelle (ou mâle) en fertilité. Les individus unisexués coexistent avec les hermaphrodites (androdioécie ou gynodioécie). Ces systèmes de reproduction mixtes présentent donc un intérêt majeur en biologie évolutive pour analyser l'évolution vers la dioécie; nous verrons plus loin leurs conditions de maintien. La transition vers la dioécie peut se faire par la réallocation de ressource d'un sexe à l'autre chez les hermaphrodites, qui se spécialisent vers la fonction mâle (ou femelle), favorisant ainsi l'extension de mutations qui confèrent la stérilité femelle (ou mâle). Par exemple, *Hebe subalpina*, une espèce morphologiquement gynodioïque présente des individus hermaphrodites qui allouent leur ressources principalement à la fonction mâle: dans ce cas, la transition de la gynodioécie à la dioécie est presque achevée (subdioécie) (Delph 1990b). Cette deuxième étape permet de fixer génétiquement la séparation des sexes.

Le déterminisme du sexe

Chez la plupart des espèces d'Angiospermes l'expression du phénotype sexuel est déterminé par des gènes nucléaires (Bull 1987); chez certaines espèces il y a différenciation de chromosomes sexuels. Cependant, des gènes cytoplasmiques peuvent intervenir dans le déterminisme de la stérilité mâle, notamment chez les espèces gynodioïques (Couvét *et al.* 1990).

L'expression du phénotype sexuel peut changer en fonction des conditions écologiques (qualité du sol, densité de peuplement, pollinisateurs, etc...) et physiologiques de l'individu (âge, taille) chez certaines espèces dioïques (plus de 60 espèces, réf. in Richards 1997). Cette labilité de l'expression du sexe peut s'observer chez quelques espèces. Par exemple, sous des conditions environnementales de stress, les individus deviennent plutôt mâles (par ex. chez *Mercurialis annua* pour la forme dioïque, chez les Cucurbitacées, généralement monoïques). Enfin, l'expression du sexe peut aussi être modulée par une maladie. Un champignon (*Ustilago violacea*) dont les spores remplacent le pollen peut induire la formation d'anthères

chez les femelles de *Silene dioica* et *Silene latifolia*, favorisant ainsi la propre dispersion de ses spores (Westergaard 1958).

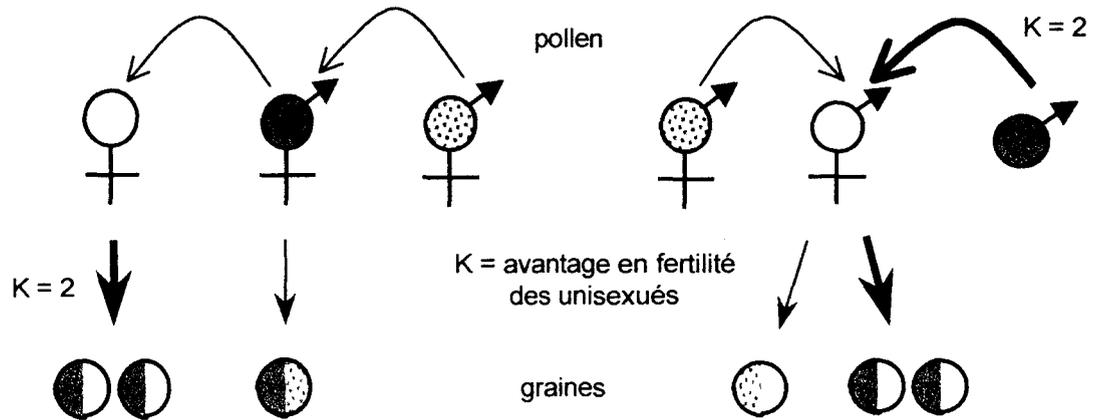
Nous allons aborder l'étude de l'androdioécie à la lumière tout d'abord des travaux théoriques réalisés sur l'évolution des systèmes de reproduction. L'androdioécie est le système symétrique de la gynodioécie, qui a fait l'objet de nombreuses études. C'est donc par rapport à ce système que nous présenterons les différents aspects théoriques du maintien de l'androdioécie.

Encadré i.3. Déterminismes nucléaire et cytoplasmique du sexe

Cas de la gynodioécie

Cas de l'androdioécie

1. Gènes nucléaires, à hérédité biparentale

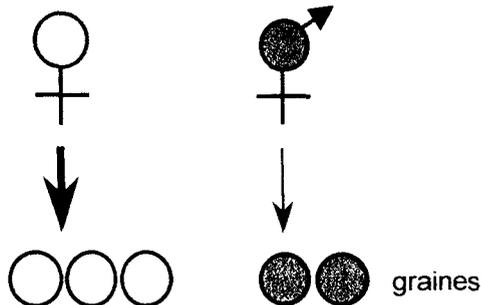


⇒ Les gènes nucléaires sont transmis par voie mâle (pollen) et par voie femelle (graines), et sont sélectionnés pour le maintien des deux fonctions, mâle et femelle.

⇒ Dans le cas d'un déterminisme nucléaire, les unisexués doivent donc avoir un avantage en fertilité au moins de deux par rapport aux hermaphrodites pour être maintenus.
 ⇒ **Avantage $K > 2$ nécessaire**

2. Gènes cytoplasmiques, à hérédité uniparentale...

...maternelle

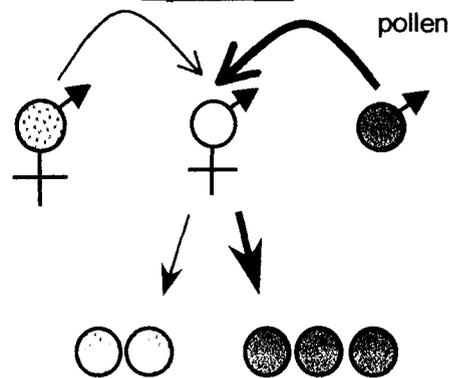


Les gènes cytoplasmiques à transmission maternelle sont K fois mieux transmis par les femelles.

⇒ **Avantage $K > 1$ nécessaire**

⇒ **Sélection pour la stérilité mâle**

...paternelle



Les gènes cytoplasmiques à transmission paternelle sont K fois mieux transmis par les mâles.

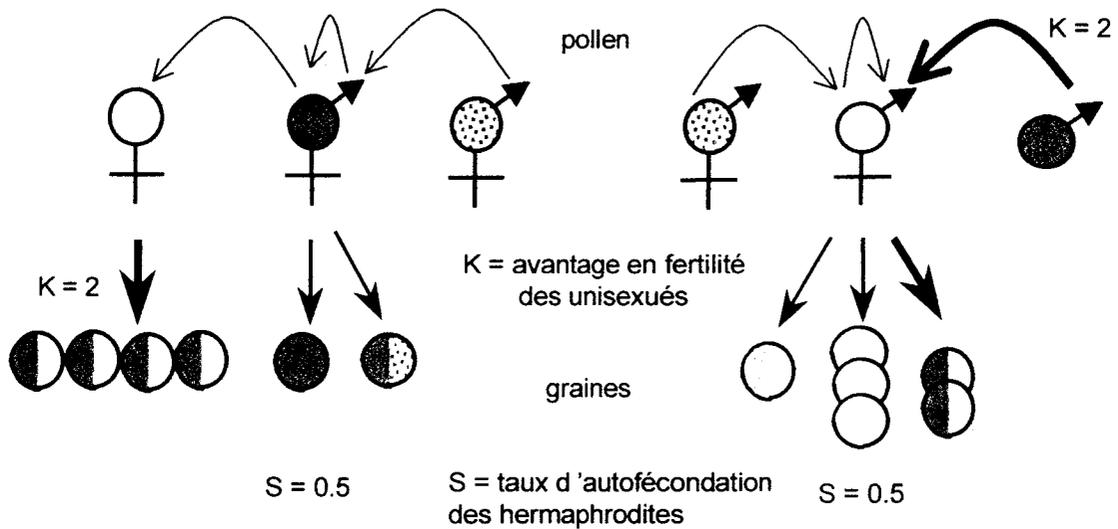
⇒ **Sélection pour la stérilité femelle**

Encadré i.3 (suite)

Cas de la gynodioécie

Cas de l'androdioécie

Gènes nucléaires, à hérédité biparentale
avec autofécondation des hermaphrodites



⇒ les femelles sont toujours allofécondées; l'avantage génétique dû à l'autofécondation est réduit.

⇒ les mâles n'ont accès qu'à une partie des ovules disponibles pour l'allofécondation. Ici, l'avantage de $2n$ n'est plus suffisant.

⇒ Avantage $K > 2$ nécessaire

⇒ Avantage $K > 2(1-s)$ nécessaire

Le maintien des mâles est plus difficile que le maintien des femelles

Tableau i.1. Modèles d'évolution de l'androdioécie. H : hermaphrodite ; M : mâle ; F : femelle

Déterminisme	Hypothèses de départ	Paramètres	Conditions pour l'existence de M	Taux de M à l'équilibre (Me)	Référence
Modèle phénotypique, calcul d'ESS	Pas de contraintes génétiques Allocations mâle et femelle des H peuvent varier.	α = pollen produit par les H/M β = ovules produits par les H / F	$\alpha^* + \beta^* > 1$ pour l'existence d'H $\alpha^* < 0.5$ pour l'existence de M Courbe de fitness set concavo-convexe.		Charnov, 1976
Un ou plusieurs locus nucléaires; plusieurs génotypes pour un même phénotype	Valeur sélective identique au sein de chaque phénotype sexuel	K_s = viabilité des zygotes M/H K_f = fécondité du pollen M/H s = taux d'autofécondation des H d = dépression de consanguinité	Si $s \neq 0$, $K_f K_s > \frac{2(1-sd)}{1-s}$ Si $s = 0$, $K_f K_s > 2$	Si $s \neq 0$, $Me = \frac{K_s K_f \frac{1-s}{1-sd} - 2}{K_f K_s \frac{1-s}{1-sd} + K_f \frac{1+s-2sd}{1-sd} - 2}$ Si $s = 0$, $Me = \frac{K_f K_s - 2}{K_f(1 + K_s) - 2}$ (encadré i.4, cas3)	Lloyd, 1975
Un gène nucléaire, allèle de stérilité dominant ou récessif	Population infinie Valeur sélective identique au sein de chaque phénotype sexuel	K = avantage mâle s = taux d'autofécondation d = dépression de consanguinité	Si $s \neq 0$, $K > \frac{2(1-sd)}{1-s}$ si $s = 0$, $K > 2$	Si $s \neq 0$, $Me = \frac{K(1-s) - 2(1-sd)}{2(K-1)(1-sd)} < 0.5$ (encadré i.4, cas 2) Si $s=0$, $Me = \frac{K-2}{2(K-1)}$ (encadré i.4, cas 1)	Charlesworth & Charlesworth, 1978
Un gène nucléaire, allèle de stérilité dominant ou récessif	Population finie Valeur sélective identique au sein de chaque phénotype sexuel	Avantage mâle = 5 Ovules produits par les H = 200 Métapopulation de 2500 sites Nb individus max par sites $K = 50\ 000$ E = Taux d'extinction I = Taux d'immigration de graines. Génération discrètes Modèle en îles et en 'stepping-stone'		Inférieur à celui obtenu en modèle panmictique, pop infinie (même valeur asymptotiquement en augmentant I/E) Equilibre obtenu stable, non dépendant des fréquences initiales. Si E élevé : allèle dominant persiste à fréquence plus élevée que allèle récessif Si E faible : allèle récessif persiste à fréquence plus élevée que allèle dominant.	Pannell, 1997

L'androdioécie, symétrique de la gynodioécie: contraintes théoriques

Les modèles d'évolution et de maintien des systèmes mixtes (gynodioécie, androdioécie) sont fondés sur l'hypothèse d'évolution à partir de l'hermaphroditisme considéré système ancestral. Selon les hypothèses formulées concernant le déterminisme du sexe, ils peuvent se classer en deux catégories: (1) les **modèles génétiques**, qui font intervenir de façon explicite le déterminisme génétique du sexe (nucléaire et en particulier cytoplasmique) et (2) les **modèles phénotypiques**, où le déterminisme du sexe n'intervient pas explicitement, pourvu qu'il soit nucléaire et sans superdominance. Les résultats des principaux modèles concernant l'androdioécie sont résumés dans le tableau i.1.

Modèles génétiques à déterminisme nucléo-cytoplasmique du sexe (voir encadré i.3)

L'encadré i.3 présente les cas symétriques de la gynodioécie et de l'androdioécie, dans les cas d'un déterminisme nucléaire ou cytoplasmique du sexe.

Les gènes nucléaires sont transmis par voies mâle et femelle, alors que les gènes cytoplasmiques sont à hérédité en majorité monoparentale. Chez la grande majorité des Angiospermes, le cytoplasme est transmis essentiellement par voie maternelle. Peu de cas de transmission uniquement paternelle de gènes cytoplasmiques ont été mis en évidence (Mogensen 1996 et voir revue dans Reboud & Zey 1994). Chez les Gymnospermes, les mitochondries sont en général à hérédité maternelle et les chloroplastes à hérédité paternelle.

Dans le cas d'une transmission maternelle, les gènes cytoplasmiques sont sélectionnés pour maximiser la voie femelle: un gène cytoplasmique qui affaiblit ou supprime la fonction mâle de la plante n'est pas désavantagé, et par une réallocation des ressources économisées sur la voie mâle, il peut être sélectionné. Inversement, les gènes nucléaires sont sélectionnés pour maximiser les deux voies de transmission. Cette divergence d'intérêt entre génomes nucléaires et cytoplasmique est un exemple de conflit génétique voir revue dans (Hurst *et al.* 1996), appelé conflit nucléo-cytoplasmique (Cosmides & Tooby 1981).

Le déterminisme du sexe de la plupart des espèces gynodioïques est nucléo-cytoplasmique, faisant intervenir des gènes cytoplasmiques de stérilité mâle, et des gènes nucléaires de restauration de la fertilité mâle (Kaul 1988; Couvet *et al.* 1990; Saumitou-Laprade *et al.* 1994).

Dans le cas symétrique de l'androdioécie, il faut envisager une transmission paternelle de gènes de stérilité femelle. Chez les animaux, des cas de masculinisation par des facteurs

Encadré i.4. Modèle phénotypique : gynodioécie et androdioécie

(d'après la thèse de Sandrine Maurice (1992), et les modèles détaillés dans le tableau i.1)

Wf, Wh, Wm: valeurs sélectives femelle, hermaphrodite, mâle.

f, h, m : fréquences de femelles, mâles et hermaphrodites dans la population.

Fe, Me, x: fréquences de femelles, de mâles et d'unisexués à l'équilibre.

K, Kf, Ks: avantages en fertilité et en viabilité des unisexués.

Sélection de femelles dans une population d'hermaphrodites	Sélection de mâles dans une population d'hermaphrodites
Les hermaphrodites se reproduisent par la voie mâle et femelle	
Les femelles ne se reproduisent que par la voie femelle, d'où la nécessité d'un avantage femelle: AF : production annuelle de graines des femelles par rapport aux hermaphrodites (en allofécondation totale)	Les mâles ne se reproduisent que par la voie mâle, d'où la nécessité d'un avantage mâle: AM : production annuelle et efficacité du pollen des mâles par rapport aux hermaphrodites.

1. Sans autofécondation	
$W_f = AF$	$W_m = \frac{AM \cdot h}{AM \cdot m + h}$
$W_h = 1 + \frac{AF \cdot f + h}{h}$	$W_h = 1 + \frac{h}{AM \cdot m + h}$
A l'équilibre, $W_f = W_h$; d'où $Fe = \frac{AF - 2}{2(AF - 1)}$	A l'équilibre, $W_m = W_h$; d'où $Me = \frac{AM - 2}{2(AM - 1)}$
Les femelles sont sélectionnées si $AF > 2$	Les mâles sont sélectionnés si $AM > 2$
Conclusion : dans les deux cas, la fréquence d'unisexué à l'équilibre (Fe ou Me, notée x) ne dépend que de son avantage en fertilité (AF ou AM, noté K):	
$x = \frac{K - 2}{2(K - 1)} \quad \forall K, x < 50\%$	

transmis par la voie mâle ont été décrits (Werren *et al.* 1981; Werren & van der Assem 1986); mais chez les Angiospermes, ce modèle reste hypothétique, et un déterminisme nucléaire a été identifié dans les deux seules espèces androdioïques où le déterminisme du sexe a été étudié (Pannell 1997b; Wolf *et al.* 1997).

Dans le cas d'un déterminisme nucléaire, les modèles phénotypiques permettent de comparer les différentes contraintes qui s'exercent sur le maintien de la gynodioécie et l'androdioécie.

Modèles phénotypiques (voir encadré i.4)

Le sex-ratio à l'équilibre

Avec ou sans autofécondation des hermaphrodites, la fréquence d'unisexués ne peut dépasser 50% si l'avantage (mâle ou femelle) n'est dû qu'à une meilleure fertilité annuelle (encadré i.4, cas 1 et 2). Cette valeur de 50% est atteinte asymptotiquement quand l'avantage tend vers l'infini. Dans un système gynodioïque, les hermaphrodites deviennent fonctionnellement mâles (Delph 1990b) et symétriquement, ils deviennent fonctionnellement femelles (Anderson & Symon 1989) dans un système androdioïque, ce qui correspond à une dioécie fonctionnelle ou de la subdioécie. On retrouve ici pour les deux systèmes le cas classique de sélection pour un sex-ratio équilibré.

Par contre, si l'avantage des unisexués est dû en partie à une meilleure survie (encadré i.4, cas 3), les valeurs à l'équilibre sont changées, et les fréquences d'unisexués peuvent alors dépasser 50% (pour les adultes, mais pas pour les zygotes) dans les deux systèmes.

Sans autofécondation: les contraintes sont identiques entre gynodioécie et androdioécie

Sans autofécondation des hermaphrodites, les modèles sont parfaitement symétriques et les contraintes sont identiques entre les deux systèmes, que l'avantage des unisexués soit exprimé en fonction de la fertilité, ou de la viabilité. La fréquence des unisexués à l'équilibre est identique (encadré i.4, cas 1 et 3).

Avec autofécondation: les contraintes sont différentes entre gynodioécie et androdioécie

En revanche, s'il y a autofécondation des hermaphrodites (s) et dépression de consanguinité (d) (encadré i.4, cas 2), les pressions de sélection sont différentes pour le maintien d'un mutant mâle stérile ou femelle stérile dans une population d'hermaphrodites. On considère ici que l'autofécondation ne consomme qu'une part négligeable du pollen, et ne diminue donc pas les potentialités pour l'allofécondation (i.e. pas de "pollen discounting"), et on considère que le taux d'autofécondation et la dépression de consanguinité sont des paramètres fixes.

Cas de la gynodioécie

Encadré i.4 (suite)	
2. Avec autofécondation	
$s = \text{taux d'autofécondation, } d = \text{dépression de consanguinité}^*$	
$W_f = AF$	$W_m = \frac{AM.(1-s).h}{AM.m+h}$
$W_h = (1-s) + 2s(1-d) + \frac{AF.f + (1-s).h}{h}$	$W_h = (1-s) + 2s(1-d) + \frac{(1-s).h}{AM.m+h}$
A l'équilibre, $W_f = W_h$; d'où $Fe = \frac{AF - 2(1-sd)}{2[AF - (1-sd)]}$	A l'équilibre, $W_m = W_h$; d'où $Me = \frac{AM \frac{1-s}{1-sd} - 2}{2(AM-1)}$
Les femelles sont sélectionnées si $AF > 2(1-sd)$	Les mâles sont sélectionnés si $AM > 2 \frac{1-s}{1-sd}$
Conclusion: les conditions de sélection ne sont plus symétriques; la sélection de mâles est plus difficile.	

3. Avec différence de fertilité et différence de survie, sans autofécondation	
Sf, Sh, Sm: survie l'année suivante des femelles, mâles et hermaphrodites	
ASf: avantage dû à la survie des femelles par rapport aux hermaphrodites = $\frac{1-S_h}{1-S_f}$;	
ASm: avantage dû à la survie des mâles par rapport aux hermaphrodites = $\frac{1-S_h}{1-S_m}$	
$W_f = AF(1+S_f+S_f^2+S_f^3+\dots) = \frac{AF}{1-S_f}$	$W_m = \frac{AM.h}{(AM.m+h)(1-S_h)}$
$W_h = \frac{1}{1-S_h} + \frac{AF.f+h}{h(1-S_h)} = \frac{2}{1-S_h} + \frac{AF.f}{h(1-S_h)}$	$W_h = \frac{1}{1-S_h} + \frac{h}{(AM.m+h)(1-S_h)}$
A l'équilibre, $W_f = W_h$; d'où $Fe = \frac{AF.AS_f - 2}{AF(1+AS_f) - 2}$	A l'équilibre, $W_m = W_h$; d'où $Me = \frac{AM.AS_m - 2}{AM(1+AS_m) - 2}$
Les femelles sont sélectionnées si $AF.AS_f > 2$	Les mâles sont sélectionnés si $AM.AS_m > 2$
Conclusion: dans les deux cas, on trouve la fréquence d'unisexués à l'équilibre (Fe ou Me, notée x) en fonction de leur avantage en survie (ASf ou ASm, notée Ks) et en fertilité (AF ou AM, notée Kf):	
$x = \frac{K_f.K_s - 2}{K_f(1+K_s) - 2} \quad x > 50\% \text{ si } K_s > \frac{K_f + 2}{K_f}$	

* Ici, ces deux paramètres sont considérés comme fixes

Les femelles sont de toutes façons allofécondées ; l'autofécondation des hermaphrodites ne modifie pas leur propre valeur sélective. Les hermaphrodites, par contre, voient leur valeur sélective femelle diminuée à cause de la dépression de consanguinité : les ovules autofécondés sont moins viables que ceux allofécondés. C'est pourquoi, dès que la dépression de consanguinité est non nulle, l'autofécondation favorise les femelles.

Cas de l'androdioécie

La partie des ovules 'réservée' à l'autofécondation par les hermaphrodites n'est plus accessible à l'allofécondation par les mâles : cela diminue leur valeur sélective relative. Cependant, les hermaphrodites également voient leur valeur sélective diminuée à cause de la dépression de consanguinité. La résultante est que l'autofécondation défavorise les mâles, sauf si la dépression est totale : dans ce cas, les ovules autofécondés sont perdus pour les mâles et les hermaphrodites, et les mâles, s'ils produisent plus de pollen, ont une meilleure valeur sélective. L'androdioécie est donc plus difficile à maintenir que la gynodioécie.

Nous allons voir en conclusion les principales conséquences de ces contraintes (mode d'hérédité et évitement de l'autofécondation) sur la stabilité des deux systèmes de reproduction.

Stabilité comparée de la gynodioécie et de l'androdioécie

La gynodioécie, système stable ou transitoire

Nous avons vu que les principales contraintes sur le maintien de la gynodioécie sont plus faibles dans le cas d'un déterminisme nucléo-cytoplasmique, et que l'autofécondation des hermaphrodites ne rend pas la sélection de mutant mâle-stérile (femelle) beaucoup plus difficile. Au contraire, la stérilité mâle favorisant l'allogamie sera sélectionnée.

Chez les Angiospermes, la gynodioécie représente l'un des systèmes les plus fréquents (7%) (Delannay 1978); de nombreux travaux expérimentaux se sont intéressés à ce système, soit comme un système intermédiaire entre l'hermaphrodisme et la dioécie, soit comme système de reproduction stable (Lewis 1942; Charlesworth & Charlesworth 1978; Bawa 1980; Ross 1981; Frank 1989; Atlan 1991; Maurice *et al.* 1994; Schultz 1994; Ronfort 1995; Pannell 1997a).

D'une part, la gynodioécie a longtemps été décrite comme un système transitoire de passage de l'hermaphrodisme à la dioécie. L'évolution vers la dioécie peut se faire dès lors que les locus qui affectent les fonctions mâle et femelle deviennent liés (Charlesworth & Charlesworth 1978). D'autre part, le déterminisme nucléo-cytoplasmique du sexe chez la plupart des Angiospermes gynodioïques sauvages (Kaul 1988; Couvet *et al.* 1990), a fait

l'objet de nombreuses études théoriques et expérimentales qui montrent notamment que ce système peut être maintenu avec des valeurs d'avantage femelle faible (inférieure à deux), et avec une dynamique à l'échelle de la métapopulation (Couvét *et al.* 1998).

L'androdioécie, système stable ou transitoire ?

L'androdioécie se différencie nettement de la gynodioécie par le déterminisme du sexe et les contraintes qui lui sont associées. Nous avons vu que la gynodioécie pouvait être maintenue grâce au déterminisme nucléo-cytoplasmique du sexe, pour lequel les contraintes sont faibles (un avantage femelle supérieur à un est suffisant au maintien des femelles), même en cas d'autofécondation des hermaphrodites. En revanche, un tel déterminisme n'est pas décrit pour l'androdioécie et dans le cadre d'un déterminisme purement nucléaire, le maintien de l'androdioécie est soumis à de fortes contraintes. De plus, l'évitement de l'autofécondation ne peut être invoqué comme pression de sélection favorisant l'apparition de l'androdioécie, contrairement à la gynodioécie, du fait de la plus grande difficulté à sélectionner des mâles dans une population d'hermaphrodites qui s'autofécondent. Ce sont sans doute ces contraintes qui sont responsables de la rareté de l'androdioécie.

Comme dans le cas de la gynodioécie, l'androdioécie a été discutée comme système transitoire de l'évolution de l'hermaphroditisme vers la dioécie (Lloyd 1975; Charlesworth, 1984). Il existe d'ailleurs des espèces initialement décrites comme morphologiquement androdioïques, qui se sont révélés être en fait subdioïques pour diverses raisons (pollen non viable ou non fonctionnel, anthères non déhiscentes), ou andromonoïques (Anderson & Symon 1989 ; Muenchow 1998; Despres & Manicacci²).

Cependant, à l'inverse de la gynodioécie, l'androdioécie apparaît comme extrêmement rare (Darwin 1877; Yampolsky & Yampolsky 1922): le terme d'androdioécie fut créé par Darwin alors qu'il n'en connaissait aucun exemple. L'existence même de ce système a été remise en question (Charlesworth 1984), jusqu'à la description d'une espèce bel et bien fonctionnellement androdioïque, *Datisca glomerata*, (Liston *et al.* 1990).

Les espèces androdioïques

Actuellement, à ma connaissance, seulement sept espèces d'Angiospermes sont fonctionnellement androdioïques, c'est à dire chez lesquelles la fertilité mâle des hermaphrodites a bien été vérifiée (voir tableau i.2).

² Is the alpine lily *Lloydia serotina* androdioecious? Soumis.

Tableau i.2. Principales caractéristiques des espèces Angiospermes fonctionnellement androdioïques.

Espèce	Famille	Type biologique	Répartition ¹	Autofertilité s, d ²	% mâles en population	Avantage mâle ³	Déterminisme du sexe	Référence
<i>Datisca glomerata</i>	Datiscacées	Herbacée pérenne anémophile	S-O Etats-Unis	s = 8 à 35% d = 0.16-0.17	0 - 24	2.93 (fert.)	2 locus Stérilité fem. récessive	(Liston <i>et al.</i> 1990) (Philbrick & Rieseberg 1994)
<i>Mercurialis annua</i>	Euphorbiacées	Annuelle anémophile	S Espagne, Maroc	Autofertile, mais allogame (protogynie)	0 - 38	4 - 10 (fert.)	1 locus Stérilité fem. dominante	(Pannell 1995; Pannell 1997b; Pannell 1997c)
<i>Schizopepon bryoniaefolius</i>	Cucurbitacées	Annuelle entomophile	Asie orientale	Autofertile et fortement endogame	0 - 28.3	Non mesuré	Pas connu	(Akimoto <i>et al.</i> 1999)
<i>Oxalis suksdorfii</i>	Oxalidées	Herbacée pérenne	Côte O Etats-Unis	Autoincompatible (tristylie)	33	Non mesuré	Pas connu	(Ornduff 1972)
<i>Fraxinus ornus</i>	Oléacées	Arbre entomophile	Europe centrale et Sud	Autofertile	50	Non mesuré	Pas connu	(Dommée <i>et al.</i> 1999)
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	Oléacées	Arbre entomophile	Japon	Fortement autostérile	10 - 49.7	8.5 - 10.4 (fert.) 2.7 (féc.)	Pas connu	(Ishida & Hiura 1998)
<i>Phillyrea angustifolia</i>	Oléacées	Arbuste anémophile	Méditerranée occidentale	Autoincompatible	30 - 78	1.73 (fert.) 2 (féc.)	Pas connu	(Strasberg 1988; Vassiliadis <i>et al.</i> ⁴)

¹ Répartition des formes androdioïques de l'espèce.

² s = taux d'autofécondation, d = dépression de consanguinité.

³ mesuré en fertilité (fert.) ou fécondité (féc.).

⁴ Vassiliadis C, Lepart J, Saumitou-Laprade P, Vernet P Self-incompatibility and male fertilisation success in *Phillyrea angustifolia* (Oleaceae). *International Journal of Plant Sciences*, sous presse.

Il faut néanmoins préciser que chez certaines autres espèces, la fertilité mâle des hermaphrodites n'a pas été vérifiée d'une part (par ex. chez *Saxifraga cernua* (Molau 1992; Molau & Prentice 1992), *Fuchsia microphylla* (Arizmendi *et al.* 1996), *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Valiente-Banuet *et al.* 1997)), et que d'autre part, certaines espèces s'avèrent être à sexe labile (par ex. *Lloydia serotina*, Manicacci et Despres, comm. pers.). Les caractéristiques de ces espèces sont données en annexe 1.

La multiplication végétative est le mode de reproduction dominant chez les deux espèces alpine-arctique *Lloydia serotina* et *Saxifraga cernua*. La reproduction sexuée semble limitée par les conditions environnementales. Chez *S. cernua* seulement, un avantage mâle en terme de production de bulbilles a été mesuré.

L'androdioécie est encore plus rare dans le règne animal, puisqu'elle n'a été décrite que chez une crevette d'eau douce *Eulimnadia texana* (Sassaman & Weeks 1993), un nématode *Caenorhabditis elegans* (Wood 1988) et un schistosome (*Uterotrema burnsi/kreffti*) (Platt & Brooks 1997). Elle est présente également chez un champignon filamenteux (*Gibberella fujikuroi*; Leslie & Klein 1996). Les caractéristiques de toutes ces espèces sont données en annexe 1.

Parmi les sept espèces d'Angiospermes androdioïques présentées dans le tableau i.2, seules trois d'entre elles suivent les prédictions des modèles *Datisca glomerata* (Liston *et al.* 1990), *Mercurialis annua* (Pannell 1997d) et *Fraxinus lanuginosa* (Ishida & Hiura 1998). Chez ces trois espèces, les fréquences des mâles en populations naturelles sont faibles; les avantages mâles élevés (en fertilité/fécondité et survie), et les hermaphrodites sont soit auto-incompatibles (*F. lanuginosa*, Ishida & Hiura 1998), soit ils sont bien autofertiles, mais fortement allogames (*D. glomerata*, Fritsch & Rieseberg 1992 et *M. annua*, Pannell 1997d). De plus, pour deux d'entre elles (*D. glomerata*, Wolf *et al.* 1997 et *M. annua*, Pannell 1997b), le déterminisme du sexe a été étudié et il s'est effectivement avéré nucléaire impliquant un à deux locus.

Les quatre espèces restantes du tableau i.2 posent problème par rapport aux attendus théoriques: deux herbacées, *Schizopepon bryoniaefolius* (Akimoto *et al.* 1999) et *Oxalis suksdorfii* (Ornduff 1972); et deux arbres, *Fraxinus ornus* (Dommée *et al.* 1999) et *Phillyrea angustifolia* (Lepart & Dommée 1992; Traveset 1994; Vassiliadis *et al.* sous presse³).

1. Le taux d'autofécondation est très élevé chez *S. bryoniaefolius* (Akimoto *et al.* 1999)

³ Vassiliadis C, Lepart J, Saumitou-Laprade P, Vernet P Self-incompatibility and male fertilisation success in *Phillyrea angustifolia* (Oleaceae). *International Journal of Plant Sciences*, sous presse.

2. Les fréquences de mâles en populations naturelles sont très élevées chez les espèces d'arbres : *P. angustifolia* (Lepart & Dommée 1992) et *F. ornus* (Dommée *et al.* 1999).
3. L'avantage mâle n'est mesuré que chez *P. angustifolia*, mais n'est pas suffisant pour expliquer les fortes fréquences de mâles observés en populations naturelles.

Cependant, diverses explications peuvent être avancées pour expliquer l'existence de l'androdioécie chez ces espèces:

1. L'autofertilité des hermaphrodites, même marginale et non significative en présence de pollen extérieur, leur permet de se reproduire même en faible densité et de coloniser de nouveaux sites (*F. ornus*). La forte autogamie de *S. bryoniaefolius* est en fait négativement corrélée à la fréquence des mâles en population; cette variation fréquence-dépendante n'est pas prise en compte dans les modèles.
2. Les fortes fréquences de mâles ne sont observées que chez les espèces ligneuses comme *F. lanuginosa* (Ishida & Hiura 1998), *F. ornus* (Dommée *et al.* 1999), *P. angustifolia* (Lepart & Dommée 1992) et *P. latifolia* (Aronne & Wilcock 1994). Une meilleure croissance végétative et survie des mâles par rapport aux hermaphrodites permettrait d'expliquer en partie ces fortes fréquences; cette hypothèse a été avancée chez *F. lanuginosa* (Ishida & Hiura 1998) et *P. angustifolia* (Strasberg 1988).

Origine de l'androdioécie

L'androdioécie est théoriquement considérée comme une étape intermédiaire de l'évolution de l'hermaphroditisme vers la dioécie (ou la séparation des sexes). Cette hypothèse est bien vérifiée pour certaines des espèces androdioïques étudiées :

Oxalis suksdorfii est clairement issue d'un hermaphrodite tristyle (Ornduff 1972) ; *Phillyrea angustifolia* présente des fleurs mâles avec pistillode, ce qui laisse supposer une origine hermaphrodite (Lepart & Dommée 1992; Traveset 1994); et *Neobuxbaumia mezcalaensis* a des espèces sœurs hermaphrodites, comme la majeure partie des Cactées (Valiente-Banuet *et al.* 1997).

Chez les animaux, l'androdioécie observée chez *Eulimnadia texana* (Sassaman & Weeks 1993), *Caenorhabditis elegans* (Wood 1988) et *Uterotrema burnsi/kreffti* (Platt & Brooks 1997) est issue d'un état ancestral hermaphrodite autofertile. Les mâles ont été produits par autofécondation des hermaphrodites. Les hermaphrodites, toujours autofertiles, restent incapables de se croiser entre eux : ils jouent le rôle de femelle. Les mâles ont, de ce fait, un avantage en fertilité par rapport aux hermaphrodites.

Chez *Gibberella fujikuroi* (Leslie & Klein 1996) les lignées femelle-stériles sont issues de lignées hermaphrodites autofertiles. Dans ce cas, ces lignées produisent des spores qui

peuvent jouer le rôle de gamètes mâles mais aussi de spores végétatives, ce qui leur confère un avantage en multiplication végétative.

Une origine dioïque est pourtant soupçonnée chez d'autres espèces.

Chez *Mercurialis annua*, l'ensemble des espèces sœurs (les 6 autres mercuriales) sont dioïques, ce qui suggère fortement une évolution de l'androdioécie à partir de la dioécie. Chez *Datisca glomerata*, une première étude phylogénétique montrait également une origine dioïque pour *Datisca glomerata* (Rieseberg *et al.* 1992); mais une étude plus récente a remis en cause cette conclusion, et montré que l'on ne pouvait trancher clairement entre une origine hermaphrodite ou dioïque (Swensen *et al.* 1998).

Contraintes de l'androdioécie dans le cadre d'un déterminisme nucléaire du sexe

En résumé, dans la mesure où toutes les espèces décrites (en particulier *Phillyrea*, Desplanque 1994) présentent très probablement un déterminisme nucléaire du sexe (*D. glomerata* et *M. annua* (Pannell 1997b; Wolf *et al.* 1997)), les contraintes liées au maintien des mâles en population seront :

1. un avantage mâle : supérieur à deux (avantage en fertilité seul, ou produit des avantages en fertilité et survie);
2. pas ou peu d'autofécondation (sauf si elle est associée à une très forte dépression de consanguinité).
3. un taux de mâles à l'équilibre inférieurs à 50% (pourvu que l'avantage mâle s'exprime en terme de fertilité seulement);

Dans le chapitre suivant, nous allons présenter plus en détail le modèle biologique de cette thèse, *Phillyrea angustifolia*.

Chapitre 1

Phillyrea angustifolia, une espèce
androdioïque ?

Chapitre 1. *Phillyrea angustifolia*, une espèce androdioïque ?

Généralités sur Phillyrea angustifolia

Position systématique au sein des Oléacées

Les Oléacées forment une famille d'environ 600 espèces réparties en 24 genres, contenant principalement des arbres et des arbustes, et quelques lianes. Leur distribution géographique est très vaste: Eurasie principalement, Afrique, Australie, Amérique. Cette famille existe dès le Miocène supérieur (présence de pollen fossiles) (Johnson 1957).

La classification présentée est la plus récente (Wallander & Albert 1999), elle fait état de 5 tribus, présentées dans le tableau 1.1. La plupart des genres sont hermaphrodites, mais il existe une grande variété de systèmes de reproduction, indiqués pour chaque genre entre parenthèses⁴.

Tableau 1.1. Les 5 tribus d'Oléacées (Wallander & Albert 1999)

Tribus	Sous-tribu	Genres (système de reproduction)
<u>Fontanesieae</u>		<i>Fontanesia</i> (H?)
<u>Forsythieae</u>		<i>Forsythia</i> (Het), <i>Abeliophyllum</i> (H)
<u>Myxopyrae</u>		<i>Myxopyrum</i> (H), <i>Nyctantes</i> , <i>Dimetra</i>
<u>Jasmineae</u>		<i>Jasminum</i> (Het), <i>Menodora</i> (H)
<u>Oleeae</u>	Syringaeae	<i>Ligustrum</i> (H), <i>Syringa</i> (H)
	Schrebereae	<i>Comoranthus</i> (H?), <i>Schrebera</i> (Het)
	Fraxineae	<i>Fraxinus</i> (H, P, A)
	Oleeae	12 genres (voir tableau 1.2)

Légende : H: hermaphrodisme; H?: les fleurs ne sont pas décrites explicitement hermaphrodites ; Het : hétérostylie ; P : polygamodioecie (présence de fleurs unisexuées), A : androdioécie.

C'est dans la sous-tribu des Oleeae répartie sur l'ensemble du globe que la plus grande diversité de systèmes de reproduction est observée (tableau 1.2) : l'androdioécie y a été décrite dans deux genres, *Phillyrea* et *Osmanthus*.

⁴ Les références sont données dans <http://www.systbot.gu.se/staff/evawal/welcome.html>

Tableau 1.2. Les genres de la sous-tribu des Oleinés et leur système de reproduction.

Genre	Système de reproduction	de Nombre d'espèces	Répartition géographique
<i>Chionanthus</i>	H	80	Amérique, Afrique, Asie, Australie
<i>Haenianthus</i>	H?	3	West Indies
<i>Noronhia</i>	H	40	Madagascar, Comores
<i>Olea</i>	H, P	1	Méditerranée
		40	Afrique du Sud, Asie du Sud, Est de l'Australie, Nouvelle Calédonie
<i>Forestiera</i>	P, D	15	Sud des Etats-Unis, Mexique; West Indies, Amérique du Sud.
<i>Priogymnanthus</i>	H?	2	Amérique du Sud
<i>Nestegis</i>	P, D	4	Nouvelle Zélande
		1	Hawaï
<i>Notelaea</i>	H	9	Australie, Tasmanie
<i>Osmanthus</i>	H?, D, A	30	SE Asie, Nouvelle Calédonie, Amérique du Nord (USA et Mexique)
<i>Phillyrea</i>	A	3	Méditerranée
<i>Picconia</i>	H?	1	Macaronésie
<i>Hesperelaea</i>	H	1	Mexique (†)

Légende : H: hermaphrodisme; H?: les fleurs ne sont pas décrites explicitement hermaphrodites ; P: polygamodioecie (présence de fleurs unisexuées) ; A: androdioécie; D: dioécie ; † : espèce éteinte.

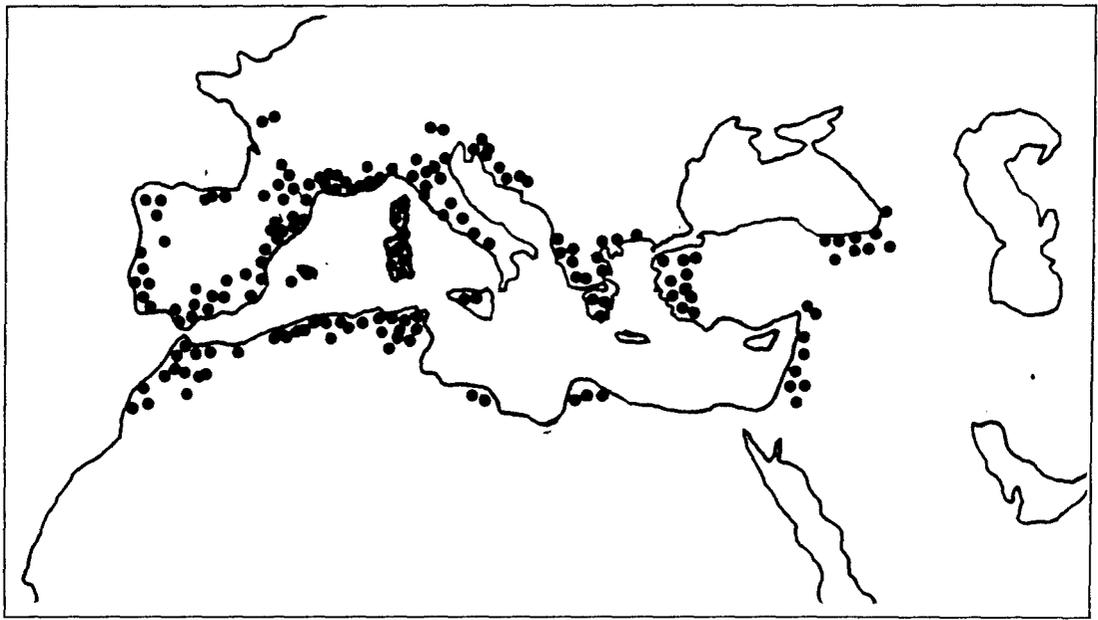
Le genre *Phillyrea*

Tournefort en 1719 donna le nom à ce genre d'arbustes méditerranéens, d'après Dioscoride.

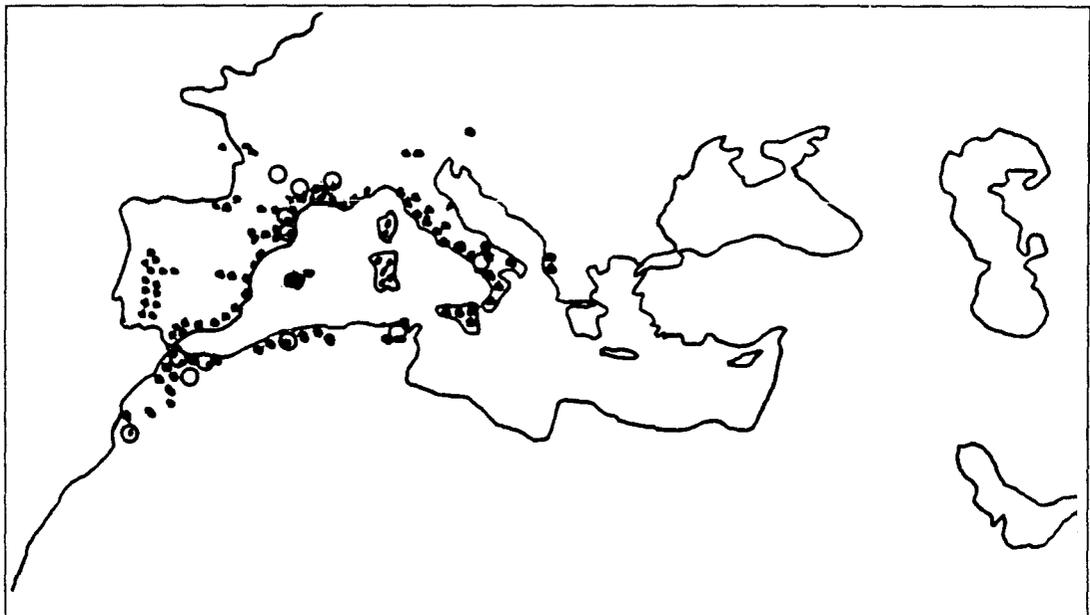
Linné en 1747 le place entre le troène (*Ligustrum*) et l'olivier (*Olea*); plusieurs espèces de *Phillyrea* furent d'ailleurs classées dans ce dernier genre (Sebastian 1956). La première version de Species Plantarum (1753) mentionne deux espèces *angustifolia* et *latifolia*, mais la seconde version (1762) en inclut une troisième, *media*, ainsi que diverses variétés. Le statut taxinomique de ces espèces varie ensuite selon les auteurs; plusieurs incluent *media* dans *latifolia*.

De fait, les distinctions entre ces espèces reposent essentiellement sur des caractères de morphologie foliaire, caractères qui présentent une très grande variabilité: toutes les formes intermédiaires peuvent être trouvées entre la feuille d'*angustifolia* et celle de *latifolia*; un botaniste a même décrit 150 sous-espèces (Sennen 1935).

Les trois espèces méditerranéennes, *angustifolia*, *latifolia* et *media* sont les plus communément admises, même s'il reste très difficile de distinguer *media* de *latifolia*; l'hypothèse d'hybridation a été souvent formulée en se basant sur la morphologie (Clos 1906;



A. • *Phillyrea latifolia*



B. • *Phillyrea angustifolia* et ○ *Phillyrea media*

Figure 1.2. Cartes de répartition des *Phillyrea angustifolia*, *latifolia* et *media*
(d'après Sebastian, 1956)

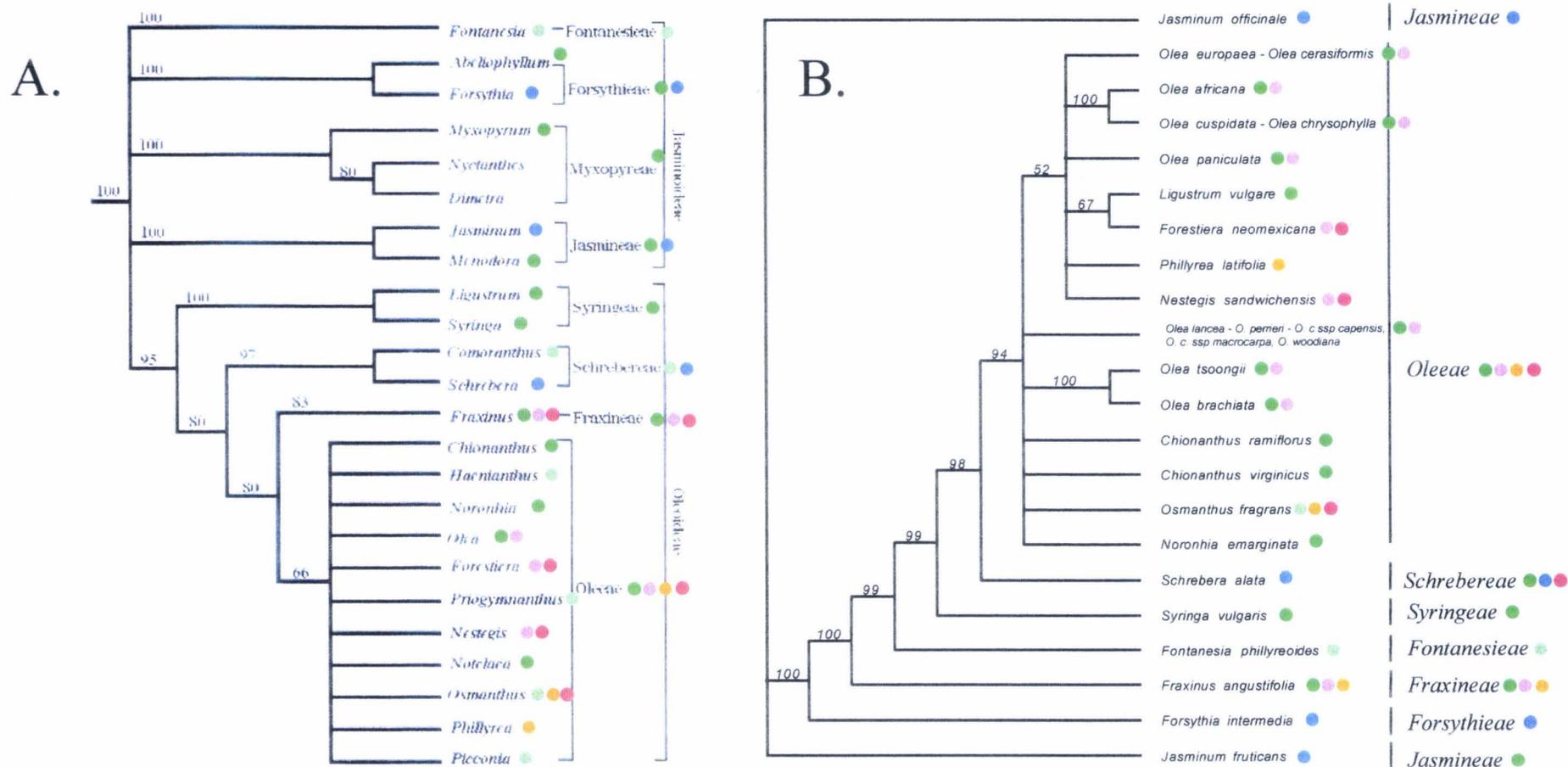


Figure 1. Phylogénies des Oléacées réalisées à partir de **A.** l'intron rps16 et la région trnL-F (chloroplastiques) (d'après Wallander et al., 1999), **B.** des RFLP chloroplastiques (d'après Bernard et al., soumis).

Légende: ● Hermaphrodisme; ● Les fleurs ne sont pas décrites explicitement hermaphrodites; ● Polygamodioécie (présence de fleurs unisexuées); ● Hétérostylie; ● Androdioécie; ● Dioécie.

Regel 1949; Sebastian 1956). Desplanque (1994) en utilisant des marqueurs chloroplastique (RFLP) a montré que des individus *angustifolia* et *latifolia* de la même région partageaient les mêmes types chloroplastiques, et étaient plus proches entre eux que des individus de la même espèce mais de régions différentes (Languedoc, Maroc, Sicile). Ce résultat montre l'existence de flux de gènes entre *latifolia* et *angustifolia*. De plus, une expérience préliminaire de pollinisation croisée entre individus *latifolia* (pollen) et *angustifolia* (hermaphrodite receveur) a permis d'obtenir des fruits (J. Lepart, comm. pers.).

Le système de reproduction de *Phillyrea latifolia* a été brièvement étudié (Aronne & Wilcock 1994) (voir annexe 1). cette espèce est morphologiquement androdioïque : les hermaphrodites produisant du pollen normal et viable, mais qui n'a pas été testé en croisements. Les mâles produisent 4.2 fois plus de pollen que les hermaphrodites. Cependant, la très forte fréquence de mâles observée sur la population étudiée pose problème : on peut se demander s'il ne s'agit pas d'une espèce subdioïque. Des croisements utilisant le pollen d'hermaphrodites permettraient de vérifier la fertilité mâle effective des hermaphrodites.

Une étude phylogénétique de la position de *Phillyrea* au sein des Oléacées pourrait permettre de déterminer l'origine de l'androdioécie : ce système de reproduction a-t-il évolué à partir de l'hermaphroditisme, ou de la dioécie ? Récemment, la phylogénies des Oléacées a été réalisée à l'aide de séquences de l'intron rps16 et de la région trnL-F (chloroplastiques) (Wallander & Albert 1999) (voir figure 1.1A) et à partir de RFLP d'ADN chloroplastique (Besnard et al., soumis⁵) (voir figure 1.1B). Si l'on se place au niveau des principales tribus, les deux phylogénies sont contradictoires. Selon celle de Wallander, l'androdioécie est apparue une fois à partir de l'hermaphroditisme, et la dioécie apparaît comme un caractère dérivé (fig. 1A, les Fraxineae apparaissent comme groupe frère des Oleae). Selon celle de Besnard et al., l'androdioécie apparaît au moins deux fois. Enfin, les deux phylogénies ne sont pas assez résolutes au sein de la tribu des Oleae pour déterminer le groupe frère de *Phillyrea* et conclure sur l'origine de l'androdioécie chez *Phillyrea*.

Ecologie et répartition géographique

Les trois espèces sont circum-méditerranéennes (Fig. 1.2). *P. latifolia* s'étend sur tout le bassin méditerranéen, jusque dans sa partie orientale (Grèce, Turquie, Israël) (Fig. 1.2A) , alors que la répartition de *P. angustifolia* est restreinte à l'ouest du bassin méditerranéen, du Portugal jusqu'à l'ex-Yougoslavie (Fig. 1.2B) (Sebastian 1956). En Languedoc, *P.*

⁵ Revision of the taxonomy of the genus *Olea* using molecular approaches. Besnard, G, Green PS et Bervillé, A. soumis à Plant Systematics and Evolution.

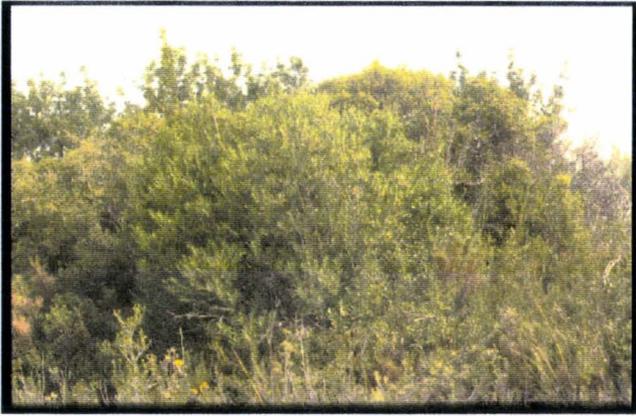


Figure 1. 3. Buisson de *Phillyrea angustifolia* en population naturelle.



Figure 1.6. Rameaux de *P. angustifolia* portant des fruits mûrs.



A. x1,5



B. x6

Figure 1.4A et B. Inflorescences hermaphrodites. Sur chaque fleur, le stigmate globuleux est bien visible entre deux étamines écartées.



A. x1,5



B. x10

Figure 1.5 A et B. Inflorescences mâles. Vous remarquerez le pistillode réduit entre deux étamines.

angustifolia se rencontre dans la zone des garrigues, où il est commun mais rarement dominant; il est présent de façon plus ou moins sporadique dans la plaine littorale. En Camargue, son extension a été observée depuis les années 40; extension due principalement au changement de mode d'utilisation de la terre, et à la dispersion de ses graines par les oiseaux (Strasberg 1987; Lepart & Debussche 1991).

Biologie de l'espèce

Appareil végétatif, croissance et survie

P. angustifolia est un arbuste à feuillage persistant (Fig. 1.3) qui peut atteindre 4m de haut. De nombreux rejets partent d'un lignotuber, et lui confèrent une forme de buisson dense et ramifié. Le lignotuber est un plateau lignifié à la base de la tige principale, à demi enterré, contenant de nombreux bourgeons dormants, et constituant une zone d'accumulation de l'amidon, ce qui permet une régénération rapide des parties aériennes après perturbation (broutage, incendie) (Strasberg 1988), mais rend très difficile la détermination précise de l'âge de l'individu.

Les mâles possèdent un plus grand nombre de rameaux et ont une meilleure croissance végétative, ainsi qu'une plus grande longévité que les hermaphrodites (Strasberg 1988).

Floraison

La floraison est abondante, un même individu peut porter plusieurs milliers de fleurs. Elle dure 3 à 4 semaines au sein d'une population, et se déroule en mars-avril. La pollinisation est anémophile (les fleurs sont sans nectar).

Les rameaux d'un an portent à l'aisselle de chaque feuille une ou deux inflorescences serrées (Figs. 1.4 et 1.5), de 4 à 9 fleurs de petite taille (2-3 mm), sans nectar, qui s'ouvrent successivement au sein d'un individu. Les mêmes individus ne fleurissent pas chaque année (obs. pers. et (Lepart & Dommée 1992)). Plusieurs botanistes avaient déjà observé chez *P. angustifolia* des individus mâles et hermaphrodites (Gerber & Kieffer 1896; Sebastian 1956).

Les fleurs mâles et hermaphrodites ont deux étamines de taille identique (fig. 1.4B et 1.5B) qui contiennent la même quantité de pollen mais avec une forte variabilité inter-individu (Lepart & Dommée 1992). Les mâles possèdent un plus grand nombre d'inflorescences par rameaux (6.34 vs. 4.66) et les inflorescences mâles possèdent un plus grand nombre de fleurs en moyenne que les inflorescences hermaphrodites (7.56 vs. 5.96; soit un avantage global en fertilité de 1.73) (Strasberg 1988). Mais l'architecture des inflorescences est identique et ne favorise pas la dispersion du pollen pour les mâles (comme c'est le cas chez la mercuriale (Pannell 1997d)).

Tableau 1.3 . Présentation des 32 stations de *P. angustifolia* du Sud de la France et des 3 stations des Baléares.

Stations du Sud de la France

● Etudiées en 1988 (Strasberg)		âge	milieu	densité	N ind	M	H	total	% fleuris	%M	Binomiale	P	
Région	station												
Camargue Nord	BV Nord	1970	prairie haute	<0,2	105	44	37	81	77,14	54,32	0.8129	NS	
	BV Clairière	1985	prairie haute	0,73	137	50	52	102	74,45	49,02	0.4606	NS	
	BV Salant	1970	sansouïre	0,4	124	60	49	109	87,90	55,05	0.8749	NS	
	BV Est	1970	sansouïre	<0,2	191	75	70	145	75,92	51,72	0.6908	NS	
	BV Sud	1942	pâturage	0,28	114	44	52	96	84,21	45,83	0.2376	NS	
	Relongues	1942	pâturage	<0,2	102	32	61	93	91,18	34,41	0.0017	**	
	BB Ilot	1970	sansouïre	<0,2	135	36	27	63	46,67	57,14	0.8963	NS	
	BB Sud	1970		<0,2	44	9	14	23	52,27	39,13	0.2024	NS	
	Cerisières	1960		0,47	131	40	78	118	90,08	33,90	0.0003	***	
	Lévadon 1	1960	levée de terre	0,56	111	49	60	109	98,20	44,95	0.1691	NS	
	Lévadon 2	1953		0,36	67	32	35	67	100,00	47,76	0.4036	NS	
	CF Nord	1978	prairie haute	<0,2	102	51	50	101	99,02	50,50	0.5788	NS	
	CF Grands	1942	prairie haute	0,02	151	88	63	151	100,00	58,28	0.983	NS	
	CF Centre	1978	prairie haute	<0,2	108	50	49	99	91,67	50,51	0.5796	NS	
	Joncs	1970	discontinue, taches de jonc	<0,2	173	72	50	122	70,52	59,02	0.9816	NS	
	Férigoulet	1942	pâturage	<0,2	124	71	46	117	94,35	60,68	0.9921	NS	
	Cabane Rouge	1942	discontinue, taches de jonc	0,26	102	47	52	99	97,06	47,47	0.3439	NS	
	Clos de la Ville	1930	friche	0,9	101	76	22	98	97,03	77,55	1.00E-08	***	
	Camargue Sud	Dune Ilot	1978	dunes	<0,2	254	70	82	152	59,84	46,05	0.1862	NS
		Dune Haute	1953	dunes	<0,2	173	59	109	168	97,11	35,12	7.00E-05	***
Dune Creux		1978	dunes	0,65	110	46	49	95	86,36	48,42	0.4188	NS	
Dune Basse		1970	dunes	-	118	48	52	100	84,75	48,00	0.3822	NS	
Dune Plate		1978	dunes	-	138	54	50	104	75,36	51,92	0.6879	NS	
● Etudiées successivement en 1985-1986-1987 (Lepart et Dommée, 1992)													
Montpellier	La Gardiole		friche depuis 1970	-	99	53	38	91	91,9	58,2	0.954	NS	
Camargue Nord	Tour du Valat1		prairie	-	149	63	74	137	91,9	46,0	0.196	NS	
Port-la-Nouvelle	Sainte Lucie		île, avec joncs	-	153	61	80	141	92,2	43,3	0.065	NS	
● Etudiées en 1997 (Vassiliadis et Lepart)													
Camargue Nord	Tour du Valat2		prairie	-	127	59	57	116	91,3	50,9	0.61	NS	
Camargue Sud	Salins A		petite dune	-	20	9	9	18	90,0	50,0	0.593	NS	
Camargue Sud	Salins B		petite dune	-	25	12	13	25	100,0	48,0	0.5	NS	
Montpellier	Grand Travers		prairie sableuse	-	106	49	56	105	99,1	46,7	0.279	NS	
Montpellier	La Boissière		garrigue, ancien champs	-	192	90	83	173	90,1	52,0	0.728	NS	
Montpellier	Montmèze		garrigue	-	106	28	67	95	89,6	29,5	4.00E-05	***	
Total	32 stations				3892	1627	1686	3313	85.123	49.11			

Stations des Baléares étudiées par Traveset (1994)

Cabrera	Port	-	31	10	21	31	100,0	32,3	0.035	NS
Cabrera	Cala Gandulf	-	31	12	19	31	100,0	38,7	0.141	NS
Majorque	Port des Canonge	-	34	7	27	34	100,0	20,6	4E-04	*
Total	3 stations	-	96	29	67		100,0	30,2	7E-05	0,0060

Légende : âge : déterminé par des photos aériennes ; densité : en nombre d'individus par m² ; Nind : nombre total d'individus dans la station ; M : mâles ; H : hermaphrodites ; Binomiale : test de l'écart par rapport à un sex-ratio de 1 : 1 ; NS : non significatif. Les stations présentant un excès significatif de mâles sont indiquées en bleu ; celles présentant un excès significatif d'hermaphrodites sont indiquées en rouge

Les fleurs hermaphrodites (Fig. 1.4) ont un stigmate bien développé, sur un style court, l'ovaire contient 4 ovules (2 par loges). Elles sont protogynes, bien que la déhiscence des anthères ait lieu alors que le stigmate est encore réceptif (autopollinisation possible). De plus, au sein d'une inflorescence, le pollen d'une fleur précoce peut atteindre les stigmates des fleurs plus tardives (geitonogamie possible au sein d'une inflorescence ou d'un rameau).

Les fleurs mâles (Fig. 1.5) n'ont qu'un pistillode très réduit sans stigmate.

Après fécondation, les fruits se développent jusqu'à leur maturité au mois de septembre: ce sont de petites drupes noires (Fig. 1.6) (5 mm), ovoïdes puis sub-globuleuses à maturité, à une seule graine (très rarement deux, obs. pers.), disséminées par les oiseaux en automne-hiver (Lepart & Debussche 1991).

La floraison est également suivie par une période végétative de croissance des rameaux jusqu'en été.

L'androdioécie chez *Phillyrea angustifolia*

La stérilité femelle et sa stabilité

Les fleurs mâles sont en réalité femelle-stérile : l'ovaire est très peu développé, et le stigmate est petit, brun-rougeâtre et avorté. La taille du pistil est significativement plus petite chez les mâles (Lepart & Dommée 1992) (Fig. 1.5).

Le suivi sur trois ans des individus en populations (Lepart & Dommée 1992) et sur 10 ans des 469 individus issus de croisements plantés au terrain d'expérience du CEFÉ à Montpellier ont montré une très grande stabilité des phénotypes sexuels (Dommée, comm. Pers.).

L'expression du sexe au sein d'un individu a été étudiée dans les populations du sud de la France, sur 20 mâles et 23 hermaphrodites. Aucune fleur hermaphrodite n'a été observée sur les individus mâles, et seulement deux hermaphrodites de la population de la Gardiole présentaient plus de 10% de fleurs mâles (Lepart & Dommée 1992). Dans le sud de l'Espagne, sur un total de 66 individus, 6 hermaphrodites présentaient de 10 à 50% de fleurs mâles ; et 2 mâles de 10 à 25% de fleurs hermaphrodites (Traveset 1994). La coexistence de fleurs mâles et hermaphrodites au sein d'un même individu suggère une origine andromonoïque. *Phillyrea media* et *latifolia* ont été décrits comme andromonoïque par Campbell (Campbell 1922) et Armenise (1956) respectivement.

Les fréquences de stérilité femelle en populations

Les fréquences de mâles ont été mesurées dans 35 stations présentées dans le tableau 1.3 ; 32 stations ont été étudiées dans le sud de la France par Strasberg (1988), Lepart et Dommée (1992) et durant ma thèse, et trois stations en Espagne dans les Baléares (Traveset, 1994).

Les fréquences de mâles observées sont différentes entre les Baléares et le Sud de la France. Dans les populations étudiées aux Baléares, les fréquences de mâles sont voisines de 30%, et significativement inférieures à 50% (G_P (1ddl) = 15,46, $P < 0.0001$, test G d'hétérogénéité ou test de 'goodness of fit' répliqué, voir Sokal & Rohlf, 1995, p. 715-724). Traveset fait également mention de fréquences semblables (25 à 30 % de mâles) pour des populations situées sur le continent (Traveset, 1994).

En revanche, dans le sud de la France, sur l'ensemble des populations étudiées les fréquences de mâles ne sont pas significativement différentes de 50% (G_P (1ddl) = 1.051, $P = 0.305$).

Par la suite, nous nous intéressons surtout aux populations du sud de la France, pour estimer l'hétérogénéité des fréquences de mâles dans une même région géographique. L'hétérogénéité est significative (G_H (31ddl) = 111.84, $P < 0.0001$, test G d'hétérogénéité ou test de 'goodness of fit' répliqué, voir Sokal & Rohlf, 1995, p. 715-724). En effet, 4 populations sur 32 présentent un excès d'hermaphrodites, comme aux Baléares (Relongues, Cerisières, Dune Haute et Montmèze, de 29.5 à 35.1% de mâles) ; et une population présente un excès de mâles (Clos de la Ville, 78% de mâles).

Les stations présentant un excès d'hermaphrodites correspondent à une installation plus ou moins récente de *Phillyrea* (Strasberg, 1988). A Relongues, la densité n'a pas augmenté depuis 1942 sous l'effet du pâturage intense par les bovins: à Cerisières, le groupe de *Phillyrea* est isolé sur une levée de terre, au milieu des sansouïres ; à Dune haute, sur le littoral, la station sur le sommet d'une dune correspond aussi à l'un des rares sites d'installation possible pour cette espèce. Enfin, à Montmèze, la population se situe dans une friche après incendie, et *Phillyrea* est en compétition avec d'autres espèces buissonnantes. Les effets de la densité ou de l'âge sur ces sex-ratio déséquilibrés ne présentent pas de tendance claire.

La station du Clos de la Ville où l'on observe un fort excès de mâles (78%) correspond au peuplement le plus âgé (1930) et le plus dense (presque un individu par m²). Dans ce peuplement, les mâles sont aussi significativement plus grands et plus larges que les hermaphrodites. Cette dernière observation suggère un avantage en croissance végétative et en survie des mâles par rapport aux hermaphrodites (Strasberg 1988).

Par ailleurs, des descendances issues de pollinisation libre d'hermaphrodites de la population de la Gardiole (Lepart & Dommée 1992) ont été plantés sur le terrain d'expérience du CEFÉ à Montpellier en 1987 (tableau 1.4). C'est sur une partie de ces individus que j'ai réalisé des

Tableau 1.4. Sex-ratio des descendance de pollinisations libres d'individus de la population de la Gardiole (Lepart & Dommée 1992) plantées sur le terrain d'expérience du CEFÉ en 1987, et (binomiale).

Mère	code	M	H	NF	morts	Total	%fleuris	%M	Binomiale	P
C1	A	5	10	3	4	22	83,33	33,33	0.092	NS
76	B	12	8	1	1	22	95,24	60,00	0.12	NS
68	C	13	7	1	1	22	95,24	65,00	0.074	NS
52	D	8	13	1	0	22	95,45	38,10	0.097	NS
43	E	6	11	5	0	22	77,27	35,29	0.094	NS
78	F	9	11	1	1	22	95,24	45,00	0.16	NS
12	G	6	12	3	1	22	85,71	33,33	0.071	NS
B3	I	0	2	1	2	5	66,67	0,00	0.25	NS
13	J	6	7	7	2	22	65,00	46,15	0.209	NS
102	K	9	6	4	3	22	78,95	60,00	0.153	NS
49	L	2	1	2	0	5	60,00	66,67	0.375	NS
46	M	4	1	0	0	5	100,00	80,00	0.156	NS
50	N	16	4	0	2	22	100,00	80,00	0.005	**
56	O	1	4	0	0	5	100,00	20,00	0.156	NS
104		12	2	0	8	22	100,00	85,71	0.006	**
40		17	4	0	1	22	100,00	80,95	0.003	**
103		10	3	8	1	22	61,90	76,92	0.035	*
Total		136	106	37	27	306	86,74	56,20	0.008	*

Code: nom de la famille (utilisé dans les expériences de pollinisation contrôlées en 1995 et 1996, voir chapitre 2) ; M : mâles, H : hermaphrodites, NF : individus non fleuris, Binomiale : test de l'écart par rapport à un sex-ratio 1 :1.

expériences de pollinisations contrôlées en 1995 et 1996 (Chapitre 2). Les sex-ratio des descendance sont globalement non significativement différents de 1 :1 (G_P (1ddl) non significatif, $P = 0.053$). Les fréquences ne sont pas homogène (G_H (17ddl) = 41,46, $P < 0.001$). En effet, dans 4 descendance sur 17, le sex-ratio est biaisé en faveur des mâles. Une meilleure survie (8 morts dans la descendance de 104) ou une plus grande précocité des mâles (8 non fleuris dans la descendance 103) peuvent expliquer en partie ces biais.

L'hérédité du sexe

Des croisements contrôlés ont été réalisés par Jacques Lepart et Bertrand Dommée, en 1987, sur 4 hermaphrodites receveurs (croisements par mâles, par hermaphrodites, et autofécondations). Les 512 individus vivants résultants de ces croisements sont suivis chaque année pour leur phénotype sexuel. A ce jour, 469 ont été sexés. Cependant, les génotypes des individus définis à l'aide de marqueurs microsatellites remettent en cause l'origine de certains

des descendants. Le génotypage de tous les individus est en cours, et permettra d'établir de façon certaine les sex-ratio dans chaque descendance, et donc d'inférer une hypothèse sur le déterminisme du sexe chez *P. angustifolia*.

Par ailleurs, nous avons vu (encadré i.3, gènes cytoplasmiques) qu'une stérilité femelle cytoplasmique à hérédité paternelle (cas androdioécie) nécessite un avantage mâle très faible ($K > 1$). La recherche de compartiments d'information génétique à hérédité paternelle a donc été entreprise chez *P. angustifolia*, ce qui a fait l'objet d'un DEA (Desplanque 1994). Des marqueurs RFLP mitochondriaux ont permis d'analyser 26 individus issus de croisements par hermaphrodite, par mâle et par autofécondation. Dans tous les cas, la mitochondrie est bien à transmission maternelle et ne peut pas être considérée comme agent responsable de la stérilité femelle. La transmission du chloroplaste, elle, n'a pas pu être analysée, car les marqueurs chloroplastiques obtenus par RFLP étaient monomorphes pour les individus des croisements. Enfin, la transmission d'éventuelles bactéries ou autres compartiments à information génétique extra-nucléaires n'a pas été analysée (mais aucun signal d'hybridation n'a été obtenu avec des sondes plasmidiques).

En conclusion, un déterminisme purement nucléaire reste le plus probable.

Les objectifs de la thèse

L'androdioécie chez *Phillyrea angustifolia* est clairement établie morphologiquement. Cependant, au regard des attendus théoriques des modèles nucléaires chez les espèces androdioïques, les fréquences de mâles proches de 50% observées dans la majorité des populations étudiées du Sud de la France ainsi que le faible avantage mâle mesuré en fertilité suggèrent que le système de reproduction chez cette espèce serait plutôt subdioïque.

La principale question abordée lors de ma thèse est donc d'établir le statut d'androdioïque fonctionnelle chez cette espèce. Dans cette optique, trois paramètres du système de reproduction seront particulièrement étudiés:

1. la fertilité mâle des hermaphrodites;
2. le succès reproducteur mâle des individus, et donc l'avantage mâle en fertilité;
3. le taux d'autofécondation des hermaphrodites.

Ces trois questions seront abordées par deux approches expérimentales :

- pollinisations contrôlées entre individus de même sexe et de sexe différents (chapitre 2), et
- analyse de paternité à l'aide de marqueurs microsatellites de descendants issus de pollinisation libre (chapitre3).

Enfin, les résultats des croisements contrôlés ont suggéré l'existence d'un lien génétique entre locus de stérilité femelle et d'incompatibilité. Dans un tel système, la fertilité mâle devient fréquence-dépendante ce qui rend les conditions de sélection de mâles moins sévères. Les résultats de la modélisation de ce système sont présentés dans le chapitre 4.

Chapitre 2

Auto-incompatibilité et succès
reproducteur mâle chez *Phillyrea*
angustifolia (Oleaceae)

Chapitre 2. Auto-incompatibilité et succès reproducteur mâle chez *Phillyrea angustifolia* (Oleaceae)

L'étude réalisée qui fait l'objet de ce chapitre se trouve sous forme d'un manuscrit accepté et sous presse dans International Journal of Plant Science: Self-incompatibility and male fertilization success in *Phillyrea angustifolia* (Oleaceae) (Christine Vassiliadis, Jacques Lepar, Pierre Saumitou-Laprade, Philippe Vernet). Je présente ici un résumé des principaux résultats de cet article.

Des études antérieures ont montré un faible avantage mâle en fertilité mesurée par la production de fleurs. Afin d'estimer de façon plus précise la fertilité mâle et l'auto-incompatibilité chez cette espèce, nous avons réalisé des pollinisations contrôlées sur un plus grand nombre d'individus avec du pollen issu de donneurs mâles, hermaphrodites, et de l'autopollen. Dans deux expériences, nous avons d'une part observé les croissances de tubes polliniques (stade pré-zygotique) et d'autre part mesuré le nombre de fruits produits (stade post-zygotique).

Les principaux résultats obtenus pour les deux expériences sont les suivants :

- Les hermaphrodites produisent du pollen fertile qui se montre efficace au moins en pollinisation par simple donneur (absence de compétition).
- Les mâles ont un avantage en fertilité réalisée (ou fécondité) de 1.93 par rapport aux hermaphrodites; cet avantage s'exprime dès le stade pré-zygotique (1.49).
- Les hermaphrodites sont auto-incompatibles.

L'auto-incompatibilité des hermaphrodites est bien en accord avec les modèles sur le maintien de l'androdioécie. La fertilité mâle des hermaphrodites suggère que l'androdioécie est potentiellement fonctionnelle chez *P. angustifolia*, elle reste à démontrer en conditions naturelles (voir chapitre 3). Le faible avantage mâle en fertilité estimé ici ne peut expliquer les fréquences auxquelles les mâles sont observés en population (50% dans la majeure partie des populations du sud de la France). Cependant, trois principaux facteurs peuvent augmenter cet avantage mâle : une floraison plus fréquente des mâles ; un avantage en viabilité ; et une meilleure aptitude du pollen mâle en situation de compétition pollinique (ce qui reste à évaluer, par analyse de paternité, voir chapitre 3). De plus, la plus forte variance du succès reproducteur observée chez les hermaphrodites ainsi que la présence de quelques croisements produisant très peu de fruits, uniquement entre hermaphrodites, peuvent suggérer une incompatibilité entre hermaphrodites.

La nature du système d'incompatibilité n'a pas été discutée dans cet article. Plusieurs arguments nous permettent de penser que le système d'incompatibilité chez *Phillyrea* est très probablement gamétophytique. D'abord, les grains de pollen sont binucléés (Armenise, 1957) comme chez *Olea* (Cuevas and Rallo, 1990) ce qui est un trait toujours corrélé au système d'incompatibilité gamétophytique (Brewbaker, 1957; Pandey, 1979); ensuite, il n'y a pas de dépôt de callose dans les cellules stigmatiques elles-mêmes, alors que ce pattern est généralement observé dans les cas d'incompatibilité sporophytique (Dumas and Knox, 1983), e.g. (Sniezko and Winiarczyk, 1996) (mais ce seul critère ne peut être considéré comme le seul signe de rejet du pollen, puisqu'il y existe des cas de rejet de pollen sans dépôt de callose sur les papilles stigmatiques (Elleman and Dickinson, 1996) ; enfin, un système gamétophytique a bien été décrit chez *Olea europea*, une espèce voisine (Brewbaker and Majumder, 1959; Cuevas, com. pers.) mais non sur des données de croisements.

Title: Self-incompatibility and male fertilization success in Phillyrea angustifolia (Oleaceae)

Authors: Christine Vassiliadis¹, Jacques Lepart², Pierre Saumitou-Laprade^{1,3}, Philippe Vernet¹

Affiliations: ¹Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales, UPRESA CNRS 8016, Université Lille 1, Bât. SN2, 2ème étage, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

²Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE) CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

³Author for correspondence and reprints; e-mail: saumitou@univ-lille1.fr.

Running title: Vassiliadis et al. Self-incompatibility and male success

Manuscript received August 1999; revised manuscript received _____

Androdioecy is a rare breeding system, in which low male frequency is expected in populations because males require a strong increase in their fertility to be maintained by selection. Phillyrea angustifolia L. has previously been reported as possibly functionally androdioecious. However, 1:1 sex-ratios have been reported and suggest functional dioecy. In this paper, we compared both pollen tube growth and siring success of male and hermaphrodite pollen in two single-donor pollination experiments. We verified at both pre- and post-zygotic levels that hermaphrodites produce functional pollen. Self-incompatibility was also clearly established. However, pollen from hermaphrodites was less efficient than male pollen. The probability of a pollen tube growing through the style was higher for male than for hermaphrodite pollen donors, and males sired twice as many fruits as hermaphrodites. The twofold male advantage in relative fecundity was mainly due to lower pollen fertility of hermaphrodites and possible cross-incompatibility among hermaphrodites.

Key-words: androdioecy, male reproductive success, Oleaceae, Phillyrea angustifolia, pollen tube growth, self-incompatibility

Introduction

Within the great diversity of breeding systems observed in the Angiosperms, the co-occurrence of male and hermaphrodite individuals within the same population, termed androdioecy, is the rarest (Darwin 1877; Yampolsky and Yampolsky 1922). According to theoretical models based on nuclear inheritance of sex, the extreme rarity of functional androdioecy (where hermaphrodites are male-fertile) is probably mainly result of (1) the large fitness gain required for male plants to be maintained by selection and (2) the fact that androdioecy does not provide an outbreeding advantage, as opposed to gynodioecy (Lloyd 1975). To be maintained in natural populations, male fertility of the male plants must be at least double that of hermaphrodites, and this increase must be infinite for a 1:1 sex-ratio to occur, corresponding to functional dioecy (i.e. where morphological hermaphrodites are male-sterile). An even greater advantage is required in partially self-fertilizing populations if there is no inbreeding depression, because fewer ovules will be available for outcrossing (Lloyd 1975; Charlesworth and Charlesworth 1978; Charlesworth 1984; Pannell 1997a). Functionally androdioecious species are thus expected to exhibit low male frequencies in populations, self-incompatibility (SI) or at least a low selfing rate, and a large male advantage.

At least three androdioecious species exhibit all three traits predicted by theoretical models.

In *Datisca glomerata* (Datisceae), a wind-pollinated perennial herb, the male frequency is consistently less than 27% in natural populations (Liston et al. 1990). In this species, hermaphrodites exhibit low selfing rates (Fritsch and Rieseberg 1992), selfed progeny suffer from inbreeding depression (Rieseberg et al. 1993), and males produce 3.8 times more pollen than hermaphrodites (Philbrick and Rieseberg 1994). In *Fraxinus lanuginosa* (Oleaceae), a wind- and insect-pollinated tree, male frequencies in populations range from 10 to 50%, hermaphrodites exhibit strong self-sterility (Ishida and Hiura 1998), and the male advantage is

3-fold in terms of flower production (Hiura and Ishida 1994) and 2.7-fold in terms of seed production (Ishida and Hiura 1998). In androdioecious populations of Mercurialis annua (Euphorbiaceae) male frequencies are always less than 30% (Pannell 1997b), hermaphrodites are self-fertile but protogyny effectively favors outcrossing (Pannell 1997d), and males produce four to ten times more pollen than hermaphrodites (Pannell 1997c). Nevertheless, labile males can bear pistillate flowers under certain environmental conditions (Pannell 1997b).

Other species are functionally androdioecious but depart from model expectations. For example, although male frequencies are less than 28% in natural population of Schizopepon bryoniaefolius (Cucurbitaceae), an entomophilous annual herb, hermaphrodites are self-compatible and populations are characterized by an autogamous mating system (Akimoto et al. 1999). The male advantage has not yet been measured in this species. However, interestingly, an increase in male frequencies in populations was correlated with a decrease in inbreeding coefficient (F_{is}) (Akimoto et al. 1999).

As Charlesworth (1984) noted, some species have been described as androdioecious, but in many cases hermaphrodites were found to be male-sterile (functionally female). In general 1:1 sex-ratios were also described in these species suggesting functional dioecy (e.g. Solanum, see Anderson and Symon 1989).

The co-occurrence of males and hermaphrodites in equal frequencies, and self-fertility of hermaphrodites has been described in two species in the Oleaceae, Phillyrea angustifolia and Fraxinus ornus (Lepart and Dommée 1992; Dommée et al. 1999). In Fraxinus ornus, an entomophilous tree, a study based on a small number of crosses showed that although male frequencies are 50%, hermaphrodites produce viable pollen and are self-fertile (Dommée et al. 1999). In P. angustifolia, a wind-pollinated shrub, preliminary studies realized in natural

conditions and based on small number of crosses (5 in Lepart and Dommée (1992) and 7 in Traveset (1994)) suggested that morphologically male plants never set seed while morphologically hermaphroditic plants produce viable pollen as well as seeds, and are often self-fertile. In addition, of the few crosses performed, both unsuccessful crosses among hermaphrodites and self-sterility were observed in some populations, suggesting possible incompatibility but these results also exhibit a strong variability (Lepart and Dommée 1992; Traveset 1994).

The aim of this study was to explore in detail the nature of the breeding system of P. angustifolia, from a natural population in southern France. Several hundred single donor crosses and self-pollinations were performed to assess the male fertility of hermaphrodites, to estimate relative male function of hermaphrodites and to extensively investigate the suspected self-incompatibility in hermaphrodites. We analyzed the germination success of pollen tubes on stigmas and fruit set in order to (1) determine if hermaphrodite pollen is able to grow through the pistil and sire seeds, (2) compare the fertilization abilities of male and hermaphrodite pollen at both pre- and post-zygotic levels, and (3) test the hypothesis that hermaphrodites are self-incompatible.

Material and methods

Study species

P. angustifolia L. (Oleaceae) is a wind-pollinated, evergreen shrub, widespread throughout the western part of the Mediterranean basin and Portugal. It is a common, but rarely dominant species in the western Mediterranean garrigue formations (Strasberg 1988).

The flowers are tightly clumped in contracted racemes (or inflorescences) bearing four to nine flowers in the axils of the leaves on the twigs produced during the previous year. In March-April, flowers open asynchronously within an individual, and flowering occurs over three to four weeks within a given population. Hermaphrodite flowers are protogynous, although anther dehiscence occurs while the stigma is still receptive. Within an inflorescence, the pollen from an early flower can easily reach the stigmas of the latest ones, so protogyny does not prevent potential geitonogamy. Males and hermaphrodites do not differ in inflorescence architecture as observed, for example, in Mercurialis annua (Pannell 1997d), therefore males do not have an advantage over hermaphrodites with respect to pollen dispersal.

The ovary contains four ovules. Fruits are one-seeded drupes, ovoid while young, subglobose at maturity and are dispersed by birds. This species has a mast flowering process for males and hermaphrodites (Lepart and Dommée 1992 and pers.; obs.).

Plant material

All pollination experiments were carried out with individuals grown from seeds collected in 1987 from 14 hermaphrodites (labelled families A to N) sampled in a previously studied population in La Gardiole near Montpellier, Southern France, composed of 91 individuals, 53 males and 38 hermaphrodites (Lepart and Dommée 1992). The seedlings were planted in 1987 in the experimental field at Montpellier, and sexual phenotypes were recorded over several flowering seasons. No sexual lability was observed on a total of 222 plants (14 to 22

individuals per family). The mean proportion of males in these families was 0.59 (SE = 0.19, N = 14, not significantly different from 0.5, (G_p (1ddl) not significant, $P = 0.053$ heterogeneity G-test, pooled, see Sokal and Rohlf, 1995). The 18 hermaphrodite recipient plants in our experimental pollinations (see below) were members of families A to J, the 16 hermaphrodite pollen donors came from families A to F, G, I, J, O, and the 18 male pollen donors from families A to F, K, L, M, N. Plants from the same family were derived from open-pollination, are therefore at least half-sibs.

Pollen tube growth experiment

One week before the flowering period, in February 1995, hermaphrodites and males were chosen in the experimental field (Table 1). On hermaphrodite recipients, twigs were covered with polyester bags (PBS International™, Scarborough North Yorkshire UK). Anthers were collected from randomly-chosen open flowers on ten male and eight hermaphrodite pollen donors (plus the self-pollen donors), and placed in small plastic tubes. To induce anther dehiscence, tubes were left in an 'air-dryer' with some Silicagel™ crystals for 1 h. Pollen was deposited on the stigmas of flowers before their own anthers dehiscid.

Two to three hermaphrodites and two to four males were selected for crosses with each of the six pollen recipients, on which two to eleven flowers were pollinated with either male or hermaphrodite self- or outcross-pollen. A total of 224 flowers were observed: 108 crossed with male donors, 75 with hermaphrodite donors and 41 selfed (Table 1).

In order to detect and evaluate any family effects, at least one hermaphrodite and one male pollen donor came from the same family as the recipient, while the other pollen donors came from different families. We performed preliminary studies which showed that pollen tubes reach the ovary within three days. Therefore, three days after pollination, flowers were fixed in formalin-acetic acid-alcohol (FAA 1:1:8) for at least 24 h then rinsed with water and

soaked in Z-colorant (Jahier et al. 1992) for 30 min at 65°C. The gynoecium of each flower was then gently crushed and examined with UV epifluorescence microscopy in a drop of aniline blue solution (Martin 1959; Jahier et al. 1992). Pollen tubes were easily distinguished from maternal tissues (Fig. 1), but could not be precisely localized. The presence of at least one pollen tube in the style (Fig. 1C) was used as a criterion for successful pollination in comparisons among treatments (see Table 2).

Fruit set experiment

Because seed production can be influenced by many factors that occur after the pollen grows through the stigma, we also measured fruit set. Pollen recipients were randomly chosen among those plants in the experimental field that were flowering in April 1996. They were not the same plants that were used in the 1995 study because most did not flower in 1996 (see Table 3). A few days before the beginning of flowering, one to two twigs per treatment were randomly selected on each of the 13 recipients. These twigs were bagged except those chosen for open-pollination, used as a positive control for seed production for each recipient.

Due to their small size, the number of flowers per twig was difficult to count for each pollination. Therefore, only the number of inflorescences per twig was determined (mean = 162, SE = 15, N = 127 twigs); we counted a total of 20,919 inflorescences and 19,541 fruits on 127 twigs (7,394 inflorescences and 5,951 fruits on 48 twigs for pollination by hermaphrodites, 8,013 inflorescences and 9,778 fruits on 44 twigs for pollination by males, 3,194 inflorescences and 494 fruits on 18 twigs for self-pollinations, and 2,318 inflorescences and 3,318 fruits on 17 twigs for open-pollinations).

In order to avoid any contamination by cross-pollen, self-pollinated twigs were only allowed to self within the bags. Due to the large amount of pollen produced by flower and to the high number of flowers open at the same moment in the bag, self-pollen was not considered as

limiting. For the outcross pollinations, eight males and eight hermaphrodites were used as pollen donors (see Table 3). To obtain pollen, two flowering twigs per pollen donor were cut, placed in paper bags, and stored in a greenhouse protected from any outside source of pollen for 12 to 24 h. Pollen was collected on a plastic sheet which was placed inside the bag under the twigs. In order to collect the maximum amount of pollen possible, approximately one volume of neutral talcum powder was mixed with one volume of pollen from each plant (Cuevas and Rallo 1990). The same volume of mixture for each pollination measured in a small pill was then placed in a small pollen dispersing spray gun (INRA, Orléans). The absence of any talcum effect on pollen viability was previously verified by *in vitro* germinability tests. The pollen was dispersed into the bag around the recipient twigs through a small hole. Each pollination was repeated at least twice during the flowering time in order to pollinate as many flowers as possible.

In September, total fruit number was counted on each open-, cross- and self-pollinated twig. Fruit set was assessed by dividing the number of fruits per twig by the number of inflorescences present before bagging (Table 3).

To facilitate comparison with other species, the number of flowers per inflorescence was also estimated on nine hermaphrodite individuals (mean over all individuals = 5.08, range = 4.5–6 according to the individual, $n = 1516$ inflorescences, $SD = 1.63$). Differences in number of flowers per inflorescence between and within individuals were observed but this should not bias our conclusions based on fruit set. First, the differences between individuals were included in the recipient effect (see below), and second, because twigs were randomly chosen, the differences between twigs within individuals were randomly distributed among the different treatments.

Statistical analyses

Pollen tube growth

Differences in germination success between self- and outcross pollination treatments were tested using Fisher exact tests (STRUC program in GENEPOP v. 3.1, 1997, Raymond and Rousset 1995), and global differences between male and hermaphrodite pollination treatments were tested by a G test for heterogeneity (Sokal and Rohlf 1995).

The presence of a pollen tube (from a pollen donor) in a given style was modeled using logistic regression with the GENMOD procedure of SAS (v. 6.12) (1995). The model examined the effects of pollen donor's sex (two levels: male or hermaphrodite), recipient identity, the sex*recipient interaction and family type (two levels: within or among families).

Fruit set

The fruit set variable was square-root transformed in order to homogenize the variances. The various effects were tested using ANOVA models in the MIXED procedure of SAS (v. 6.12) (1995).

To test the relative fertility according to the effect of the pollen donor's sex (two levels: male or hermaphrodite, fixed), the recipient (random) and the pollen donor identity (nested within sex effect, random), we used a mixed partially-nested ANOVA model.

We performed a complete two-way ANOVA with a recipient effect (random) and a treatment effect (t, either open- or self-pollination, fixed) to compare fruit set after self- and open-pollination. The Tukey's Studentized range test was used to compare means for different treatments (open-, self-, x M, and x H pollinated).

Results

Pollen tube growth

Male fertility of hermaphrodites

Pollen from hermaphrodites germinated on the stigmas of 37 of the 75 pollinated flowers (Table 2, column x H). Therefore hermaphrodites produce potentially functional pollen.

Relative pollen fertilities of hermaphrodites and males

Male pollen germinated better than hermaphrodite pollen (Fig. 2): the difference between male and hermaphrodite donors in the proportion of flowers with a pollen tube in the style was significant (G test for heterogeneity, $P = 0.009$). Male pollen was 1.49 times more capable of growing into the style than hermaphrodite pollen, and its germination success rate was more homogeneous (CV = 16.6% vs. 53.6%). The variance in pollen success was significantly lower among male pollen donors than among hermaphrodite pollen donors (F test, $P = 0.004$). Pollen tube growth was also significantly influenced by the stylar tissue (Fisher's exact test, recipient effect, $P < 0.0001$). The logistic regression results showed significant sex ($P < 0.0001$) and recipient ($P < 0.0001$) effects, but neither the sex*recipient interaction nor the family effect were significant ($P = 0.36$ and $P = 0.47$, respectively).

Self-incompatibility

Both self- and outcross-pollen grains germinated on the stigma surface. However, after self-pollination, pollen tubes penetrated neither the stigma nor the style (Fig. 1A): only 1 out of 41 selfed flowers showed pollen tubes within the style or the ovary 3 days after pollination (Table 2, Self column). Conversely, within cross-pollinated flowers (Fig. 1B) pollen tubes grew along stigmatic transmitting tissues: the difference in pollen tube growth between self- and cross-pollinated flowers was significant for four of the six recipients (Table 2, both self vs. x M, and self vs. x H). Self-incompatibility therefore occurred at the pre-zygotic level.

Generally two bundles of pollen tubes reached the upper end of the style. At this level, a single pollen tube (rarely two) was able to grow through the style towards the ovary (Fig. 1C). This is an extreme case of pollen tube attrition. In the ovary, a callose-rich segment at the end of the pollen tube can usually be seen in contact with the ovule.

Fruit set

Male fertility of hermaphrodites

Hermaphrodites sired seeds on all of the 13 hermaphrodite recipients tested (Table 3), and thus are potentially male fertile.

Relative male fertilities of hermaphrodites and males, and cross-incompatibility

Male pollen donors sired significantly more fruits (1.93 times on average) than hermaphrodite pollen donors (Table 4, effect of pollen donor sex). Again, male pollen donors exhibited more evenly distributed fertilization success than hermaphrodite donors (Fig. 3). In addition, a significant difference among hermaphrodite recipients was observed (Table 4, recipient effect). Actually, variation in fruits per inflorescence within families after open-pollination was high, and the recipient effect was again significant ($F_{12,11} = 5.84$, $P = 0.0044$). Thus, some recipients were better fruit producers than others in the year of the study. Further, the interaction between hermaphrodite recipient and donor identity nested within sex (Table 4, recipient*donor(sex)) was highly significant, demonstrating differences in receptivity of hermaphrodites according to the donor's identity.

Self-incompatibility

Self-pollinated twigs set very few fruits compared to the other types of crosses (0.14 fruits per inflorescence, $SE = 0.04$, $N = 18$, i.e. 0.028 fruits/flower with 5.08 flowers/inflorescence), that is to say, eleven times fewer than open-pollinated twigs (1.58 $SE = 0.22$, $N = 17$; Fig. 3) and this difference was highly significant (treatment effect, $F_{1,12} = 78.54$, $P < 0.0001$). Controlled

pollinations using male pollen were as successful as open-pollinations (paired t test, $P = 0.404$). Therefore, the poor performance of self-pollen is not an artifact of the bagging of the twigs. One hermaphrodite (H.3), however, set only 2.2 times less than by open-pollination, which suggests that self-incompatibility may not be strict.

Cross-incompatibility

Since we noticed that some crosses had low fruit set and were thus putatively incompatible, we explored in more detail the recipient*donor(sex) interaction. As there is considerable difference in fruit set after self-pollination, we have used the value of each fruit set after self-pollination as a threshold below which crosses are deemed incompatible. Using this threshold, we found 3 incompatible crosses out of the 49 performed (labelled * in Table 3), all were H x H crosses. This was not due to a higher relatedness between pollen donors and recipients in H x H crosses than in M x H crosses. Indeed, the three crosses between siblings, G.22 x G.2, E.12 x E.11 and G.1 x G.13, were fully compatible. When the fruit set values were corrected for the previously mentioned recipient effect (by dividing by open-pollinated fruit set values), one additional incompatible cross was revealed (Table 3, **). This, again, involved a hermaphrodite pollen donor. After these incompatible crosses were removed from the ANOVA analysis on fertility, no change was observed in the different effects tested.

Discussion

We have established that (1) hermaphrodites are clearly male-fertile; (2) hermaphrodites are strongly self-incompatible; and (3) male pollen donors were more successful than hermaphrodite pollen donors. These three results have been demonstrated at both pre- and postzygotic levels.

1. Male fertility of hermaphrodites

Most hermaphrodites were potentially male-fertile: 80% of hermaphrodite pollen donors showed pollen tube growth in styles of recipient flowers and 80% successfully produced seeds, with the best hermaphrodites being as fertile as the males. This result, based on a substantial number of crosses, confirms the male fertility of hermaphrodites and thus differs from the earlier work on the same population (Lepart and Dommée, 1992); but confirms results on others populations (Lepart and Dommée, 1992; Traveset, 1994).

Two individuals (B.2 and E.11 in Table 1) showed no or very few pollen tube growth in the styles of the two recipients tested. Male sterility is the most likely cause.

2. Relative male fertility

A male fertility advantage was found at both pre- and post-zygotic stages, such that the hermaphrodites were half as fertile as males (Table 4, sex effect). The prezygotic male advantage of 1.49 was reinforced at the fruit set level, where the male advantage rose to 1.93. The lower male fertility of hermaphrodites can be attributed to two non-mutually exclusive causes: first, a lower pollen quality of hermaphrodites, and second, unsuccessful crosses more frequent among hermaphrodites that we will discuss later.

We showed that the hermaphrodites were globally less successful than males in single-donor pollination. This suggests that hermaphrodites may be much less successful at siring seeds in natural conditions. Indeed, different pollen donors are likely to compete on stigmas. In this

situation, pollen germination and pollen tube growth are likely to be affected. Because the hermaphrodites are less efficient pollen donors, and because their male fertility has a high variance, pollen donor competition may decrease the relative male fertility of hermaphrodites (e.g. see Marshall, 1991) in P. angustifolia.

Strong pollen attrition (Cruzan 1989; Cruzan and Barrett 1996) was observed, which suggests that pollen competition occurs for access to ovules: after cross-pollination by males or hermaphrodites, pollen tube bundles converged towards the mid part of the style and thereafter just one pollen tube grew to reach the ovary (two pollen tubes observed in only 7% of pistils). This explains the almost exclusive production of single-seeded drupes (rarely two-seeded, pers. obs.) even though flowers contain four ovules. As far as we know, such strong attrition has previously been described only in Olea europea (Bradley and Griggs 1963; Cuevas et al. 1994b) and Pistacia vera (Martínez-Pallé and Herrero 1998).

In addition, two factors suggest that male relative fitness of hermaphrodites was probably overestimated in our study. First, males seem to flower more frequently and more abundantly than hermaphrodites (J. Lepart and C. Vassiliadis, pers.obs.), which would lower the relative male fecundity of hermaphrodites. Second, better survival and vegetative growth of males have been observed (Lepart and Dommée 1992), which could strongly reduce the relative hermaphrodite viability.

3. Self-incompatibility

We found that hermaphrodite P. angustifolia individuals in the population studied were self-incompatible. Almost no self-pollen tubes were found within the style or ovary effectively preventing fertilization at the pre-zygotic level. We observed pollen tube growth patterns such as swollen, forked, and coiled tubes, and swollen tube ends (Fig.1) that are indicative of strong SI (Dumas and Knox 1983) and are similar to those reported in self-incompatible

varieties of the closely related Olea europea (Bradley and Griggs 1963; Cuevas and Rallo 1990; Cuevas et al. 1994a). This confirms on a larger number of individuals previous observations in the 'La Gardiole' population (Lepart and Dommée 1992) where self-pollinations resulted in very low or no fruit set, suggesting strong SI.

Selfing resulted in very few fruits per flower compared to open-pollination: an eleven-fold difference was observed (2.8% vs. 31%). This low relative fertilization success of self-pollen is probably mainly due to SI as observed at the pre-zygotic level, but also post-zygotic phenomenon occurring during the maturation period, as early inbreeding depression and selective fruit abortion cannot be excluded. The occurrence of self-incompatibility was also inferred from a weak (5%) fruit:flower ratio in one of two P. angustifolia populations studied (Traveset 1994). Similar values were obtained in self-incompatible O. europea varieties, where the fruit:flower ratio ranged from 0% to 2.8% in selfed twigs, versus 10.5% after cross-pollination (Bradley and Griggs 1963).

Self-incompatibility of hermaphrodites, or very low outcrossing rates, is one of the conditions required by model predictions for a species to be functionally androdioecious (Lloyd 1975). It is interesting to observe that except for the strongly self-sterile Fraxinus lanuginosa (Ishida and Hiura 1998) and P. angustifolia (this study), most other androdioecious species are self-fertile. However, in the predominantly selfing Schizopepon bryoniaefolius, the presence of males reduces the selfing rate (Akimoto et al. 1999), and the other species have high outcrossing rates: Datisca glomerata suffers a high inbreeding depression (Rieseberg et al. 1993). In Mercurialis annua, and Fraxinus ornus hermaphrodites can still reproduce by self-fertilization in colonizing or low density populations (Pannell 1997d; Dommée et al. 1999).

4. Unsuccessful crosses among hermaphrodites

The substantial number of single-donor cross pollinations allowed us to detect some cases of unsuccessful pollinations among hermaphrodites only. Both a genetic incompatibility system and inbreeding depression can lead to unsuccessful crosses. The occurrence of self-incompatibility at the prezygotic level in this study suggests the existence of a genetic incompatibility system. Nevertheless, the frequency of incompatible crosses among unrelated individuals is limited by the number of S -alleles (Vekemans et al. 1998).

Some hermaphrodites had very low siring success (in terms of fruit set) on one recipient, but high siring success on the other recipient plant on which they were tested (cf. Table 2). This effect is not due to experimental methods (i.e. bagging effect or age of flowers), since controlled pollinations using males resulted in a fruit set as high as observed in open-pollinations. Nor is this siring success variation due to a recipient effect or to flower aging, since other crosses performed on the same plant at the same time were successful. In addition, similar contrasting success rates in HxH crosses occurred at the pre-zygotic level (see Table 1). The high variation of pollen tube germination observed in hermaphrodites, may be in fact due to cross-incompatibility phenomena.

5. Maintenance of male fertility of hermaphrodites: evolutionary significance of androdioecy

Even if we suppose that males are better competitors for ovules in populations, the question of the maintenance of the potential male fertility of hermaphrodites still remains. Two elements may allow the resolution of this paradox. First, male fertility of hermaphrodites may ensure their reproduction in a hermaphrodite or newly founded population, where there is no competition with male pollen. This argument would be in agreement with the population dynamics of *P. angustifolia* which has been shown to be invading Camargue in the past five decades (Strasberg, 1988). Nevertheless, in *P. angustifolia*, this argument is contradicted by

the strong self-incompatibility observed. Second, long-term evolutionary trends of this mixed breeding system can be invoked. Self-incompatibility should suggest breakdown of dioecy rather than an evolution toward dioecy (Charlesworth 1995); but the presence of a relict pistil in male flowers is compatible with an evolution from hermaphroditism to dioecy, as suggested by Lepart and Dommée (1992). Thus, the androdioecy observed in *P. angustifolia* may be transient and recent, i.e. the lower male fertility of hermaphrodites can be interpreted as a female-biased functional gender (as defined in Lloyd 1980), and some of them may be already male-sterile (as we have observed). Indeed, low male frequencies (from 20 to 38%) and gender inconsistency occur in males and hermaphrodites in Spanish populations (Traveset 1994). Various breeding systems are observed in related genera. Andromonoecy is described in *Olea* species and both hermaphroditism and dioecy are present in the genera close to *P.* Unfortunately, the phylogeny of these genera has not yet been resolved (Eva Wallander, pers. com.), and thus we cannot speculate on any one evolutionary scenario.

Acknowledgements

The authors especially thank John D. Thompson for all his encouragement and constructive suggestions, Oscar Gaggioti, Myriam Valero, and Frédérique Viard for their comments on previous version of the manuscript; Deborah Charlesworth Jacqui Shykoff and Carolyn Engel for their helpful suggestions on the final version, and both anonymous reviewers. We also thank Patrick Baldet from CEMAGREF, and the INRA Recherches Forestières (Orléans) for providing the pollination spray gun.

Literature cited

- Akimoto J, T Fukuhara, K Kikuzawa 1999 Sex ratios and genetic variation in a functionally androdioecious species, *Schizopepon bryoniaefolius* (Cucurbitaceae). *Am J Bot* 86: 880-886.
- Anderson GJ, DE Symon 1989 Functional dioecy and andromonoecy in *Solanum*. *Evolution* 43: 204-219.
- Bradley MV, WH Griggs 1963 Morphological evidence of incompatibility in *Olea europaea* L. *Phytomorphology* 13: 141-156.
- Charlesworth B, D Charlesworth 1978 A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *Am Nat* 112: 975-997.
- Charlesworth D 1984 Androdioecy and the evolution of dioecy. *Biol J Linn Soc* 23: 333-348.
- Charlesworth D. 1995. Distribution of dioecy and self-incompatibility in angiosperms. in PJ Greenwood, PH Harvey, M Slatkin [eds.], *Evolution, essays in honour of John Maynard Smith*, 237-268. Cambridge University Press, Cambridge.
- Cruzan MB 1989 Pollen tube attrition in *Erythronium grandiflorum*. *Am J Bot* 76: 562-570.
- Cruzan MB, SCH Barrett 1996 Postpollination mechanisms influencing mating patterns and fecundity: an example from *Eichhornia paniculata*. *Am Nat* 147: 576-598.
- Cuevas J, L Rallo 1990 Response to cross-pollination in olive trees with different levels of flowering. *Acta Horticulturae* 286: 179-182.
- Cuevas J, L Rallo, HF Rapoport 1994a Pollen-pistil incompatibility differences between Manzanillo and Frantoio olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Hortscience* 29: 541.
- Cuevas J, L Rallo, HF Rapoport 1994b Staining procedure for the observation of olive pollen tube behaviour. *Acta Horticulturae* 356: 264-267.
- Darwin C 1877 *The different forms of flowers on plants of the same species*. The University of Chicago Press, Chicago. 352 pp.

Dommée B, A Geslot, JD Thompson, M Reille, N Denelle. 1999 Androdioecy in the entomophilous tree *Fraxinus ornus* (Oleaceae). *New Phytol* 143: 419-426.

Dumas C, RB Knox 1983 Callose and determination of pistil variability and incompatibility. *Theor Appl Genet* 67: 1-10.

Fritsch P, LH Rieseberg 1992 High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature* 359: 633-636.

Hiura T, K Ishida 1994 Reproductive ecology in *Fraxinus lanuginosa*. I. Breeding structure. *Trans Hokkaido Br Jpn For Soc* 42: 58-60.

Ishida K, T Hiura 1998 Pollen fertility and flowering phenology in an androdioecious tree, *Fraxinus lanuginosa* (Oleaceae), in Hokkaido, Japan. *Int J Plant Sci* 159: 941-947.

Jahier J *et al.* 1992 *Techniques de cytogénétique végétale*. Tec et Doc, Lavoisier, Paris.

Lepart J, B Dommée 1992 Is *Phillyrea angustifolia* L. (Oleaceae) an androdioecious species ? *Bot J Linn Soc* 108: 375-387.

Liston A, LH Rieseberg, TS Elias 1990 Functional androdioecy in the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature* 343: 641-642.

Lloyd DG 1975 The maintenance of gynodioecy and androdioecy in angiosperms. *Genetica* 45: 325-339.

Lloyd DG 1980 Sexual strategies in plants III. A quantitative method for describing the gender of plants. *Bot J Linn Soc* 18: 103-108.

Marshall DL 1991 Nonrandom mating in wild radish: variation in pollen donor success and effects of multiple paternity among one- to six-donor pollinations. *Am J Bot* 78: 1404-1418.

Martin FW 1959 Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol* 34: 125-128.

- Martínez-Pallé E, M Herrero 1998 Pollen tube pathway in chalazogamous *Pistacia vera*. Int J Plant Sci 159: 566-574.
- Pannell J 1997a The maintenance of gynodioecy and androdioecy in a metapopulation. Evolution 51: 10-20.
- Pannell J 1997b Mixed genetic and environmental sex determination in an androdioecious population of *Mercurialis annua*. Heredity 78: 50-56.
- Pannell J 1997c Variation in sex ratios and sex allocation in androdioecious *Mercurialis annua*. J. Ecol. 85: 57-69.
- Pannell J 1997d Widespread functional androdioecy in *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae). Biol J Linn Soc 61: 95-116.
- Philbrick CT, LH Rieseberg 1994 Pollen production in the androdioecious *Datisca glomerata* (Datiscaceae): Implications for breeding system equilibrium. Pl Sp Biol 9: 43-46.
- Raymond M, F Rousset 1995 GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Hered 86: 248-249.
- Rieseberg LH, CT Philbrick, PE Pack, P Fritsch. 1993 Inbreeding depression in androdioecious populations of *Datisca glomerata* (Datiscaceae). Am J Bot 80: 757-762.
- SAS. 1995. Statistical analysis system user's guide: statistics. S.A.S. Institute, Cary, N.C.
- Sokal RR, FJ Rohlf 1995 Biometry. (third edn.). W. H. Freeman and Company, New York, USA. 887 pp.
- Strasberg D 1988. Androdioécie et dynamique de populations chez *Phillyrea angustifolia* en Camargue. DEA Sciences de l'Evolution et Ecologie, USTL, EPHE, INAPG.
- Traveset A 1994 Reproductive biology of *Phillyrea angustifolia* L. (Oleaceae) and effect of galling-insects on its reproductive output. Bot J Linn Soc 114: 153-166.

Vekemans X, MH Schierup, FB Christiansen 1998 Mate availability and fecundity selection in multi-allelic self-incompatibility systems in plants. *Evolution* 52: 19-29.

Yampolsky C, H Yampolsky 1922 Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. *Bibliotheca Genetica* 3: 1-62.

Table 1

**Number of Flowers with at least one Pollen Tube in the Style over the Total
Number of Flowers pollinated in the Pollen Tube Growth Experiment**

Pollen donors	Hermaphrodite recipients					
	A.11	B.8	C.10	D.3	E.2	F.5
Males						
A.8	7/8	2/4				
A.12	6/7	3/7				
B.5	6/8	1/4				
B.11	4/5	0/1				
C.5			5/6	4/6		
C.11			4/5	5/5		
D.12			6/7	3/6		
D.4			3/3	0/3*		
E.9					4/7	3/4
F.1					4/6	5/6
Total: 75/108	23/28	6/16	18/21	12/20	8/13	8/10
Hermaphrodites						
A.5	7/7	0/3*				
A.1	3/3	1/4				
B.2	0/7*					
C.22			3/6			
C.8			5/11	3/3		
D.5			7/7	0/3*		
E.11					0/5*	1/5
F.11					1/5	6/6
Total: 37/75	10/17	1/7	15/24	3/6	1/10	7/11
Self: 1/41	0/7*	1/10*	0/6*	0/9*	0/4*	0/5*

Note. * = no pollen tubes observed in any of the flowers' style (see text).

Table 2

Results of the Fisher Exact Test Analysis of Pollen Tube Growth on six Hermaphrodite Recipients after the Different Pollination Treatments.

	x M	x H	Self	Self vs. x H	Self vs. x M	Self vs. x H, x M
Hermaphrodite recipients	Pt/tot	Pt/tot	Pt/tot	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
A.11	23/28	10/17	0/7	0.019	< 0.001*	< 0.001*
B.8	6/16	1/7	1/10	0.669	0.190	0.330
C.10	18/21	15/24	0/6	0.017	0.0003*	0.001*
D.3	12/20	3/6	0/9	0.045	0.003*	0.007*
E.2	8/13	1/10	0/4	0.714	0.082	0.021
F.5	8/10	7/11	0/5	0.033	0.007*	0.031
Total	75/108	37/75	1/41	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*

Note. Pt = number of flowers with at least one pollen tube in the style; tot = total number of flowers observed; x H = flowers crossed with hermaphrodite pollen; x M = with male pollen; Self = selfed flowers; * = still significant after Bonferroni correction performed on each column.

Table 3

Mean Number of Fruit per Inflorescence (Number of Twigs) for Each Pollination in the Fruit Set Experiment

Pollen donors	Hermaphrodite recipients												
	G.2	H.3	E.11	I.1	G.22	G.12	E.1	B.12	G.13	J.10	A.1	A.11	A.13
Males													
K.2	0.645 (2)	1.278 (2)	0.752 (2)	2.171 (2)									
L.1	0.301 (1)	2.251 (2)	0.818 (2)	1.260 (1)									
M.1					1.185 (2)	1.682 (2)	0.850 (1)						
L.9					1.542 (2)	1.975 (2)	0.579 (2)						
N.16								1.805 (2)	1.902 (2)	1.978 (2)			
L.21								1.530 (2)	1.539 (2)	0.692 (2)			
L.11											1.069 (2)	m	m
N.12											3.342 (2)	1.545 (2)	0.292 (1)
Hermaphrodites													
E.12	0.109 (2)	2.288 (2)	0.741 (2)	1.545 (2)									
G.22	0.714 (2)	0.538 (2)	0.049 (1)*	0.340 (2)									
I.1					0.814 (2)	0.724 (2)	1.596 (2)						
J.4					0.828 (2)	1.246 (2)	0.882 (1)						
D.1								0.987 (2)	0.278 (2)	0.695 (2)			
G.1								0.335 (2)**	1.542 (2)	m			
O.1											0.447 (2)	0.222 (2)	0.013 (2)*
D.2											2.089 (2)	0.119 (2)	0.032 (2)*
Self-pollination	0.023 (1)	0.343 (1)	0.194 (1)	0.062 (1)	0.265 (2)	0.202 (1)	0.171 (1)	0.192 (2)	m	0.213 (2)	0.088 (3)	0.062 (1)	0.033 (2)
Open-pollination	0.851 (1)	0.757 (1)	1.236 (1)	1.530 (1)	1.441 (2)	2.446 (2)	1.187 (1)	2.858 (2)	0.992 (1)	3.186 (1)	1.365 (1)	1.246 (2)	0.732 (1)

Note. Fruit set value after self pollination is used as threshold for cross-incompatibility detection. In order to take into account possible recipient effect, fruit set value in cross-fertilization was corrected by dividing by open-pollinated fruit set value.* and **: incompatible crosses, without and with correction respectively; m: missing value

Table 4**Results of Mixed, Partially Nested Analysis of Variance
on the Number of Fruits per Inflorescence**

Source	df	Mean Squares	<i>F</i>	<i>P</i>	df
Pollen Donor Sex	1	2.434	53.75	0.0002	1
Donor(Sex)	11	0.165	1.02	ns	9
Recipient	10	0.053	8.26	0.0011	10
Recipient *Sex	9	0.1669	0.31	ns	7
Recipient *Donor (Sex)	15	0.1703	3.49	0.0007	10
Residual	42	0.0487			36

Figure legends

Fig. 1. Pollen tube growth (white) within stigma and style of flowers that were fixed nine days after hand-pollination. Bars: 100 μ m

- A. Self-pollinated stigma. Self-pollen tubes have emerged from pollen grains and just grown on the long stigmatic cells (blue). Some are longer and irregular with forked ends, most are short, curly, and can hardly be distinguished from the stigma cells.
- B. Cross-pollinated stigma. Long pollen tubes have grown through the stigma to the style. They are guided by transmitting tissue bundles converging at the upper end of the style. Only one (rarely two, 6.2% of total observed cross-pollinated pistils) pollen tube grows to the ovary, where it reaches one of the four ovules.
- C. Cross-pollinated pistil showing pollen tube bundles from the stigma to the style and only one pollen tube in the style. The pistil was gently crushed in order to remove external, fluorescent tissues and easily detect pollen tubes.

Fig. 2. Proportion of flowers with a pollen tube in the style after cross-pollination with pollen from hermaphrodites (A) and males (B) performed on two hermaphrodite recipients each (total of six recipients, see Table 2) The proportion of flowers containing pollen tubes was significantly higher for male pollen donors (0.70, SD = 0.12, N = 10) than for hermaphrodite pollen donors (0.47, SD = 0.25, N = 8, pollen donor's sex effect, $P = 0.009$). Male donors were potentially 1.49 times more effective at fertilizing ovules than hermaphrodites.

Fig. 3. Mean fruit sets after different pollination treatments performed on 3 – 4 hermaphrodite recipients each (total of 13 hermaphrodite recipients, see Table 2), one or two twigs per treatment per individual. A: H x H crosses; B: M x H crosses.

Fig. 4. Mean number of fruit per inflorescence after different pollination treatments on 13 recipients (see Table 3). Self: self-pollination; x H: (pollinations using) pollen from hermaphrodite donors; x M: (pollinations using) pollen from male donors; Open: open-pollination. The difference between the male and hermaphrodite treatments was significant (t-test, $P < 0.05$). The mean fruit set for male donors (1.42, SD = 0.78) was not significantly different from open-pollination treatment (1.58, SD = 0.84), but was highly significantly different from hermaphrodite donors (0.71, SD = 0.64). Male donors were twice as effective as hermaphrodites ones at siring seeds.

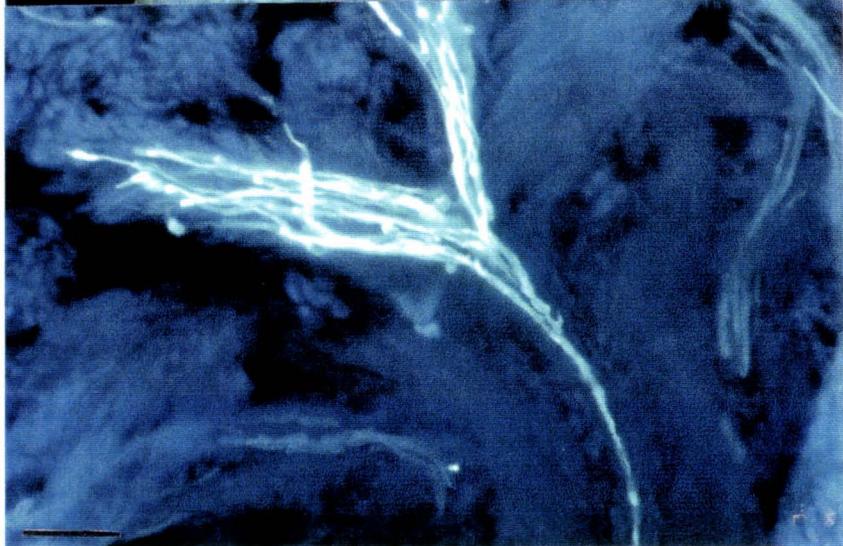
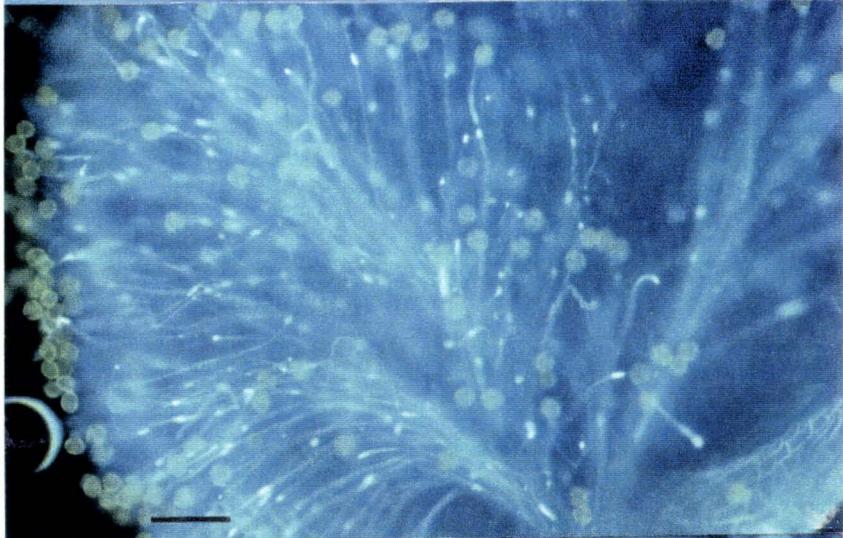
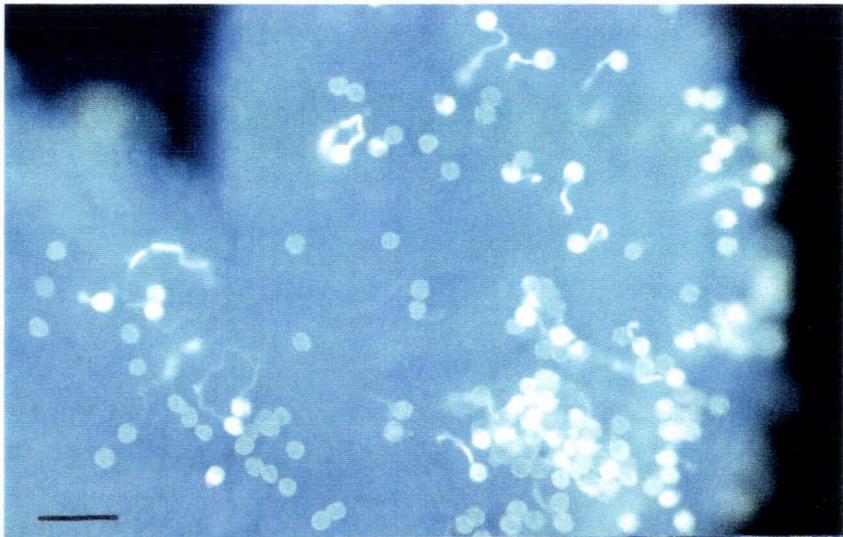


Figure 2

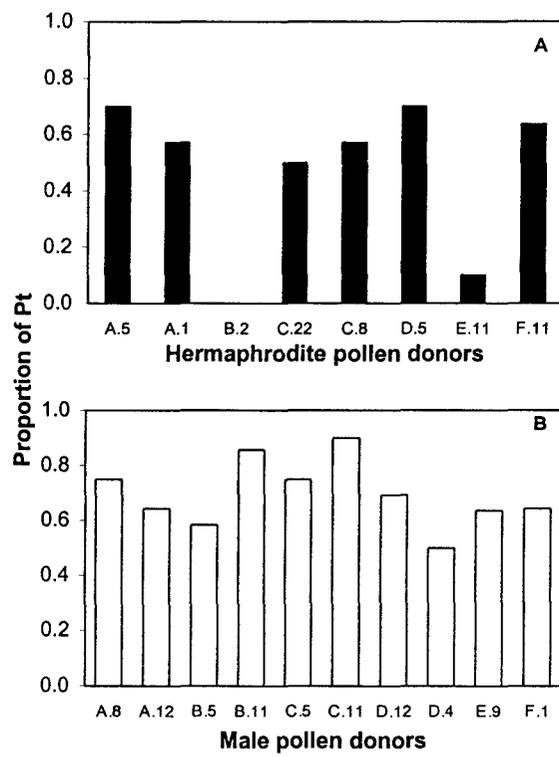


Figure 3

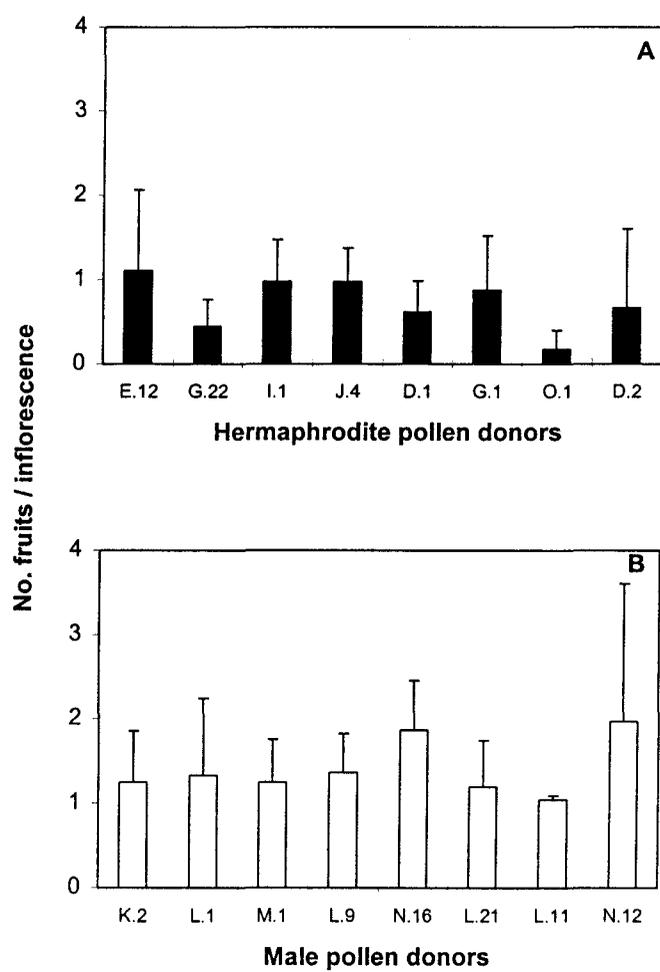
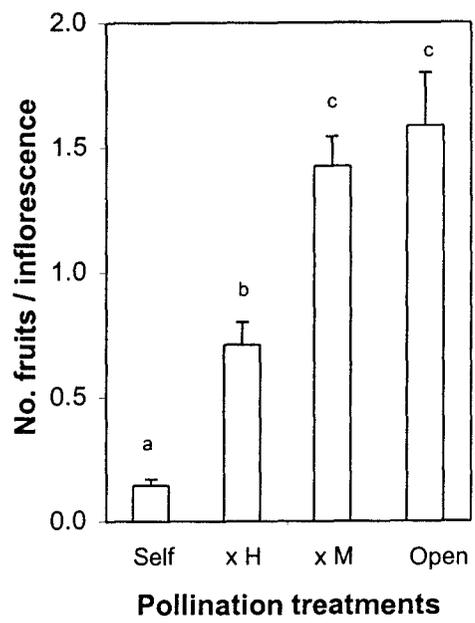


Figure 4



Chapitre 3

L'estimation du succès reproducteur
mâle par analyse de paternité en
population naturelle

Chapitre 3. L'estimation du succès reproducteur mâle par analyse de paternité en population naturelle

Généralités sur les analyses de paternité

d'après (Schnabel 1998)

Chaque descendant issu d'un événement de reproduction sexuée est le produit d'une fécondation, entre deux gamètes parentaux réalisant les fonctions mâle et femelle d'un ou deux individus. Deux types de questions peuvent alors se poser :

1. L'analyse du système de reproduction (au sens de 'mating system'): estimation de l'autofécondation vs. allofécondation. Le modèle de reproduction mixte ou 'mixed mating model' (Ritland & El Kassaby 1985) permet l'estimation du taux d'autofécondation au sein d'une descendance maternelle.
2. L'identification du père ou analyse de paternité au sens strict. Deux objectifs principaux sont généralement visés :

(1) estimer les **distances de dispersion** des gamètes mâles : ceci permet de comparer le flux de gènes réalisé avec le flux de gène potentiel. Chez les espèces entomophiles, la courbe de dispersion potentielle, étudiée par l'étude du comportement des insectes pollinisateurs ou par marquage de pollen, est leptokurtique. La courbe de dispersion estimée par des analyses de paternité s'avère généralement beaucoup plus plate (ex. *Asclepias exaltata*, espèce herbacée pérenne entomophile Broyles & Wyatt 1991). Cette différence entre dispersion potentielle et dispersion effective vient notamment du fait que les études de paternité prennent en compte les événements post-zygotiques (dépression de consanguinité) et de 'carryover'. Chez les espèces anémophiles, des méthodes analogues à celle proposée par Ritland (1985) ont été développées pour estimer le flux de gènes entre parcelles et la distance de dispersion du pollen dans le cas d'arbres anémophiles (modèle de voisinage, voir Adams & Birkes 1989; Adams *et al.* 1992). La notion de flux caché de gènes ('cryptic gene flow') a été également développée (Devlin & Ellstrand 1990a): il s'agit de l'erreur commise en attribuant un père de la population étudiée, alors que le père réel est hors de la population (voir aussi (Schnabel & Hamrick 1995)). La dispersion à longue distance, ainsi que la dispersion du pollen intra-population ont été en particulier bien étudiées chez les arbres avec des marqueurs allozymes (par ex. Boshier *et al.* 1995; Schnabel & Hamrick 1995; Burczyk *et al.* 1996; Nason *et al.* 1996 ; Stacy *et al.* 1996; Burczyk & Prat 1997) ou avec des microsatellites (Chase *et al.* 1996; Dow & Ashley 1996; Dawson *et al.* 1997; Dow & Ashley 1998; Streiff 1998). L'étude de la

dispersion du pollen peut être également abordée à l'intérieur même d'une parcelle, finesse que permettent justement les analyses de paternité (par ex. Streiff *et al.* 1999).

(2) estimer le **succès reproducteur mâle** des individus, c'est à dire évaluer la contribution de chaque mâle à la descendance, ce que nous allons développer ici.

L'identification du père qui correspond à l'**analyse de paternité** au sens strict a fait un bond en avant ces dix dernières années grâce au développement de marqueurs hypervariables permettant de typer les descendants et d'inférer la paternité en comparant les génotypes des descendants aux génotypes des pères potentiels (Queller *et al.* 1993; Chase *et al.* 1996; Dow & Ashley 1996).

Un cortège de méthodes statistiques a été développé. Ces méthodes appartiennent à trois types distincts :

- (1) Les méthodes d'exclusions (Chakraborty *et al.* 1974; Chakraborty *et al.* 1988) dont le but est d'exclure les pères potentiels génétiquement incompatibles avec le descendant.
- (2) Les méthodes dites catégoriques basées sur des analyses de maximum de vraisemblance (Thompson 1975; Thompson 1976; Meagher 1986) qui consistent à attribuer la paternité au père potentiel qui a la plus grande vraisemblance.
- (3) L'assignation ou attribution fractionnelle de paternité (Devlin *et al.* 1988) qui distribue les paternités selon la vraisemblance de chaque père possible.

Nous allons présenter les bases statistiques de ces différentes méthodes.

Méthode d'exclusion

Dans la méthodologie classique, le but est d'exclure autant de pères candidats possibles de la paternité d'un descendant particulier en utilisant les génotypes multilocus, pour différencier et éliminer les parents génétiquement incompatibles avec le descendant. Si cette procédure conduit à un seul mâle non-exclu, la paternité est assignée à ce mâle (Chakraborty *et al.* 1974). Ces méthodes ont été développées dans le cadre des affaires criminelles et les cas litigieux de paternité en médecine légale. L'efficacité des analyses de paternité dépend de la probabilité d'exclure les pères potentiels⁶ sur la seule base de leur génotype multilocus. Cette probabilité d'exclusion (PE) est fonction du nombre de locus utilisés, du nombre d'allèles et des fréquences alléliques dans la population pour chaque locus. Elle est une mesure de la puissance du jeu de marqueurs génétiques pour une analyse de paternité.

⁶ La PE exprime aussi la probabilité qu'un mâle pris au hasard dans la population soit exclu sachant les génotypes de la mère et du descendant, la probabilité moyenne qu'un mâle soit exclu (pour tous les couples mère-descendant), ou la proportion attendue de mâles exclus.

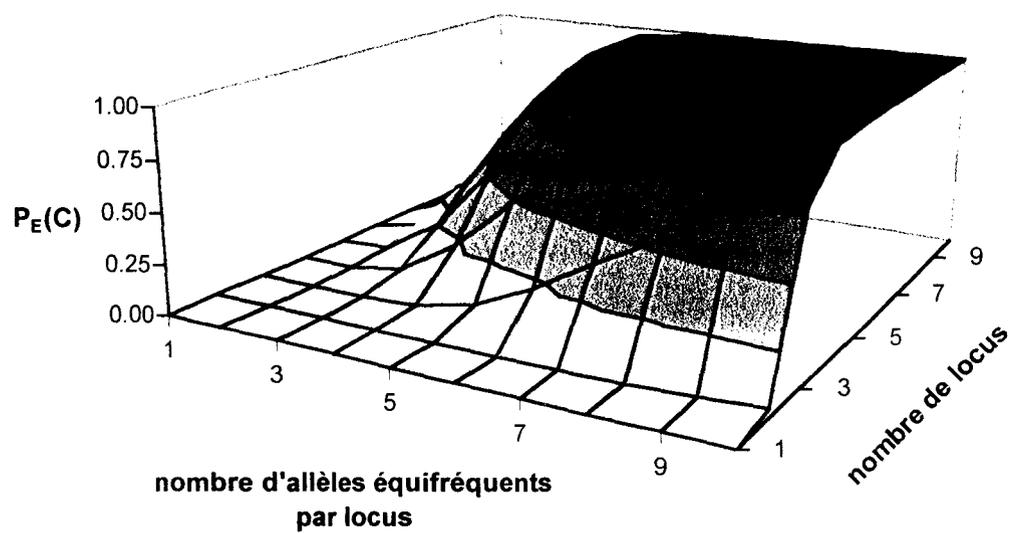


Figure 3.1. Probabilité d'exclusion $(PE(C))^{N-1}$ de tous les mâles sauf le vrai père ($N=25$ pères potentiels), en fonction du nombre de locus et du nombre d'allèles équilibrés par locus (voir équation 1 dans le texte)

Pour un locus L donné (Chakraborty *et al.* 1988; Weir 1996), la PE est donnée par l'équation suivante:

$$\text{où } a_k = \sum_{i=1}^{A_L} (p_i)^k$$

avec p_i la fréquence de l'allèle i au locus L, et A_L le nombre d'allèles observés au locus L.

La valeur maximale de PE est atteinte pour des allèles équi-fréquents (fréquence $a = 1/A_L$)

$$PE_L = 1 - 2a_2 + a_3 + 3(a_2 a_3 - a_5) - 2(a_2^2 - a_4)$$

(Weir 1996) (équation 1) :

$$PE_L = 1 - 2a + a^2 - 5a^3 + 3a^4$$

Sur m locus non liés, la probabilité d'exclusion globale est:

Mais dans une population avec N mâles, la probabilité que *tous* les $N-1$ mâles (sauf le vrai père) soient exclus est donnée par :

$$[PE(C)]^{N-1}$$

La puissance d'analyse est donc d'autant plus faible que le nombre de pères possibles est grand (voir Fig. 3.1). Le pouvoir d'exclusion est inversement corrélé au nombre de pères possibles, et donc la taille de la population étudiée. C'est pour cela que les premières analyses ont été réalisées sur des populations expérimentales de petites tailles, ou de petites populations naturelles (peu de pères candidats).

Cependant, l'exclusion seule peut être insuffisante pour résoudre de façon univoque la paternité dans de nombreux cas, même en utilisant des marqueurs très polymorphes (i. e. même si la PE est très élevée (Chakraborty *et al.* 1988)). Plusieurs parents génétiquement compatibles peuvent être obtenus pour une large proportion de descendants.

Le mâle le plus vraisemblable ('most-likely')

La méthode du 'most likely' développée par Meagher (1986) sur une population naturelle de *Chamaelirium luteum* (herbacée hermaphrodite) sur des données allozymiques, permet de déterminer le mâle le plus vraisemblable lorsque plusieurs mâles pourraient (génétiquement) être le père. Elle est basée sur le calcul de la vraisemblance de paternité pour chacun des mâles possibles (ou indice de paternité, dans les analyses humaines), dont le calcul est basé sur le théorème de probabilité conditionnelle de Bayes. Cette vraisemblance est le rapport de la vraisemblance que le mâle en question soit le père (hypothèse H1) sur la vraisemblance

qu'un mâle pris au hasard soit le père (hypothèse H2), sachant les génotypes observés du trio mère, descendant, père putatif (D):

$$L(H_1, H_2|D) = \frac{P(D|H_1)}{P(D|H_2)} = \frac{T(E_k|F_i, M_{j^*}) \cdot P(F_i) \cdot P(M_{j^*})}{T(E_k|F_i) \cdot P(F_i) \cdot P(M_{j^*})}$$

avec E_k : génotype du descendant; F_i : génotype de la mère, M_{j^*} : génotype du père putatif; M_j : génotype de n'importe quel père possible pris au hasard dans la population; et T: probabilité de transition mendélienne (probabilité qu'un descendant avec un génotype E_k soit produit par une mère F_i pollinisée par un père de génotype M_j).

Le parent mâle ayant la vraisemblance maximale est considéré comme étant le père. La paternité est assignée au mâle ayant le plus fort 'LOD score' (ratio de logarithme des vraisemblances), sans probabilité *a priori*.

Cette méthode présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, elle introduit un biais en faveur des mâles homozygotes, qui sont toujours choisis comme plus vraisemblables lorsqu'ils sont compatibles avec le descendant. Leur fertilité est donc surestimée. Devlin et al. (1988) proposent alors une méthode pour limiter ce biais: la paternité est partagée entre différents pères, proportionnellement à leurs vraisemblances relatives (voir 'Attribution fractionnelle de paternité').

Ensuite, le parent le plus vraisemblable est choisi arbitrairement comme le vrai père, sans regarder la vraisemblance des autres mâles. Marshall et al. (1998) proposent une méthode qui permet de donner une valeur statistique au choix du père le plus vraisemblable (voir plus loin le détail de cette méthode avec l'utilisation du logiciel CERVUS).

Enfin, elle ne permet pas de résoudre les scores égaux: si deux ou plusieurs pères potentiels ont la même vraisemblance, la paternité n'est assignée à personne.

Attribution fractionnelle de paternité

(Devlin *et al.* 1988; Roeder *et al.* 1989; Smouse & Meagher 1994).

Méthode d'attribution fractionnelle de paternité (Devlin et al. 1988)

Elle permet d'assigner les paternités fractionnelles à tous les mâles non exclus, en fonction de leur vraisemblance relative. La probabilité qu'un mâle M_{j^*} (sur r mâles potentiels dans la population, M_1, \dots, M_r) soit le père d'un descendant ayant un génotype E_k , d'une mère F_i :

$$P(M_{j^*}|F_i, E_k) = \frac{T(E_k|F_i, M_{j^*})}{\sum_{j=1}^r T(E_k|F_i, M_j)}$$

avec T = probabilité de transition mendélienne; M_{j^*} = génotype du mâle en question (chaque mâle a la même fertilité *a priori*).

Cette même formule peut être modifiée avec l'introduction d'une probabilité *a priori* de paternité pour M_j et M_{j^*} , en fonction de paramètres écologiques qui le rendent plus ou moins probable d'être père de E_k (Adams *et al.* 1992):

$$P(M_{j^*}|F_i, E_k) = \frac{P(E_k|F_i, M_{j^*})\Phi_{j^*}}{\sum_{j=1}^n P(E_k|M_j)\Phi_j}$$

avec Φ fonction de la fertilité, la distance, la phénologie, etc. ou une combinaison de ces facteurs.

Mais en général, on fait l'hypothèse que les probabilités *a priori* sont identiques pour tous les pères possibles. Cette méthode présente alors l'inconvénient de systématiquement sous-estimer la variance du succès reproducteur (Devlin & Ellstrand 1990b).

Estimation par maximum de vraisemblance de la fertilité mâle

Cette méthode développée par (Roeder *et al.* 1989) est également basée sur l'attribution fractionnelle ; elle permet d'estimer les fertilités mâles, en s'affranchissant du problème des probabilités *a priori*. La fertilité relative de chaque mâle est estimée par maximum de vraisemblance (algorithme itératif, qui ajuste ce paramètre, afin d'obtenir une distribution de génotypes de descendants la plus proche possible de celle observée). Schoen et Stewart (1986) ont établi cette méthode pour les Gymnospermes (le génotype du gamète femelle est connu, et donc par déduction celui du pollen). Roeder et al. (1989) proposent un modèle plus

général pour les diploïdes dépourvus de structures mégagamétophytiques propres aux Gymnospermes; il faut un nombre de descendants supérieur au nombre de pères potentiels à estimer; et chaque père possible doit avoir un génotype multilocus (diploïde) unique.

*Analyse de paternité chez *Phillyrea angustifolia**

Introduction

L'androdioécie - coexistence de mâles et d'hermaphrodites dans les populations naturelles - est un système rare; très peu d'espèces ont été étudiées à ce jour (sept espèces, voir Introduction, les espèces androdioïques). La rareté de ce système est due sans doute en partie aux conditions de maintien des mâles en population (voir Introduction) :

- un avantage mâle supérieur à deux (avantage en fertilité seul, ou produit des avantages en fertilité et survie) par rapport aux hermaphrodites;
- pas ou peu d'autofécondation (sauf si elle est associée à une très forte dépression de consanguinité);
- et sous un déterminisme nucléaire, des taux de mâles à l'équilibre inférieurs à 50% (pourvu que l'avantage mâle s'exprime en terme de fertilité seulement).

Peu d'espèces suivent ces conditions (*Datisca glomerata* (Liston *et al.* 1990), *Mercurialis annua* (Pannell 1997d), *Fraxinus lanuginosa* (Ishida & Hiura 1998)).

Phillyrea angustifolia, arbuste méditerranéen anémophile, est potentiellement fonctionnellement androdioïque (Lepart & Dommée 1992; Traveset 1994). Cependant, les fréquences de mâles observées en populations naturelles sont voisines de 50% (voir Chapitre 1), ce qui laisse supposer une subdioécie (non-fonctionnalité de la voie mâle des hermaphrodites).

Des estimations du succès reproducteur des hermaphrodites par la voie mâle ont été obtenues (résultats présentés dans le Chapitre 2, Vassiliadis *et al.* accepté) par des mesures de production de fruits après pollinisations contrôlées. Ces mesures ont montré notamment l'autoincompatibilité des hermaphrodites, la fonctionnalité du pollen produit par les hermaphrodites et un succès reproducteur des mâles double par rapport à celui des hermaphrodites.

Comment expliquer alors le maintien de la fertilité mâle des hermaphrodites observée dans nos croisements ? Les pollinisations ont été réalisées avec un seul donneur de pollen pour chaque rameau. Nos estimations de succès reproducteur mâle ne tenaient donc pas compte des éventuels effets de compétition pollinique entre mâles et hermaphrodites. Et nous ne pouvons donc pas affirmer qu'en population naturelle, la fonction mâle des hermaphrodites n'est pas

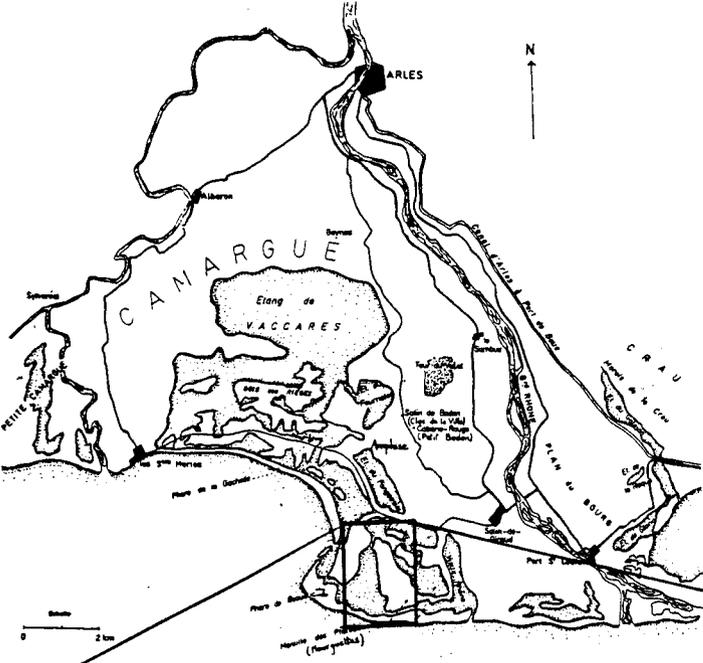
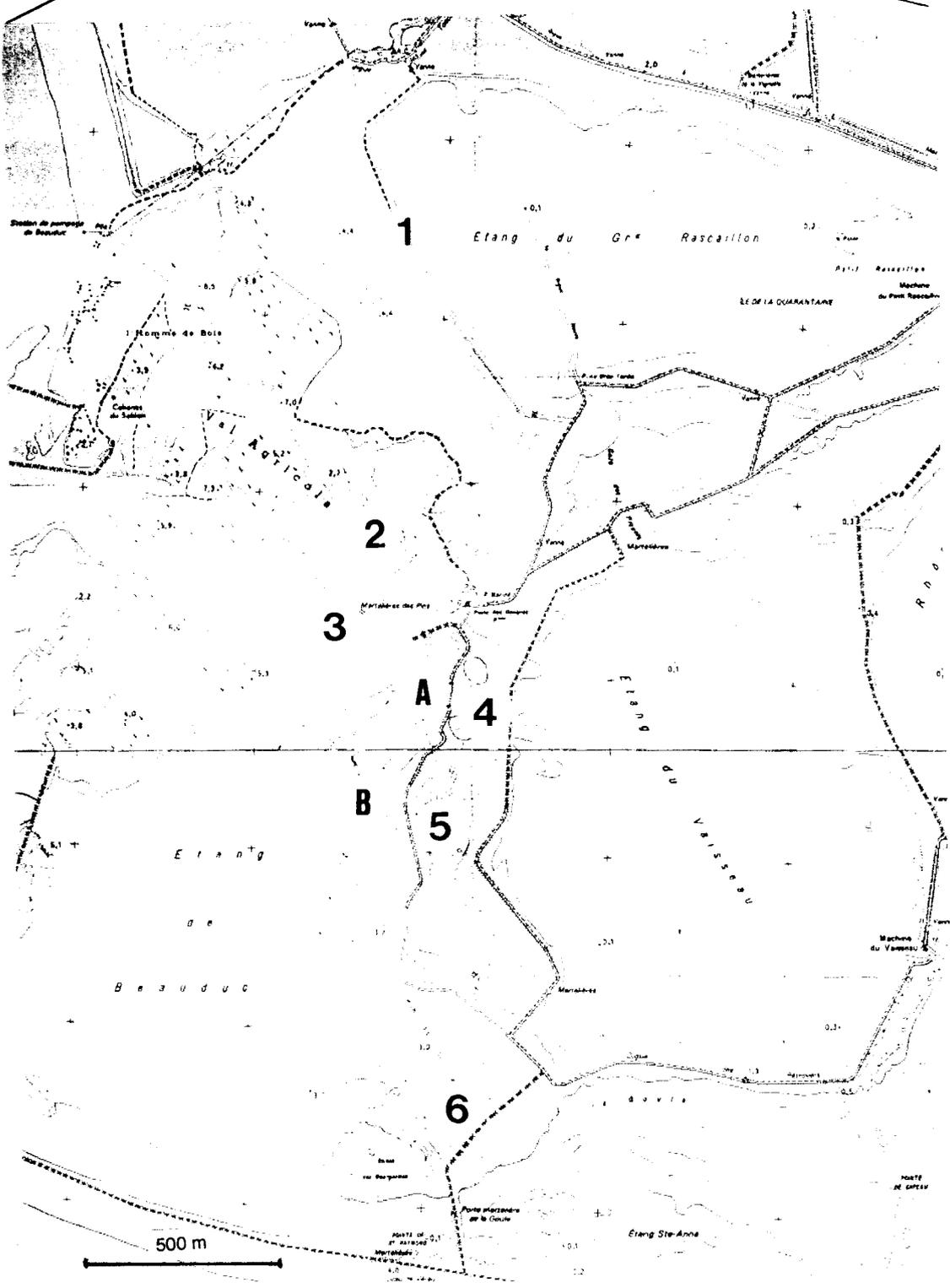


Figure 3.2. Localisation en Camargue (ci-contre) des deux populations des Salins A et B et des autres peuplements de *Phillyrea angustifolia* les plus proches numérotés de 1 à 6 (ci-dessous).



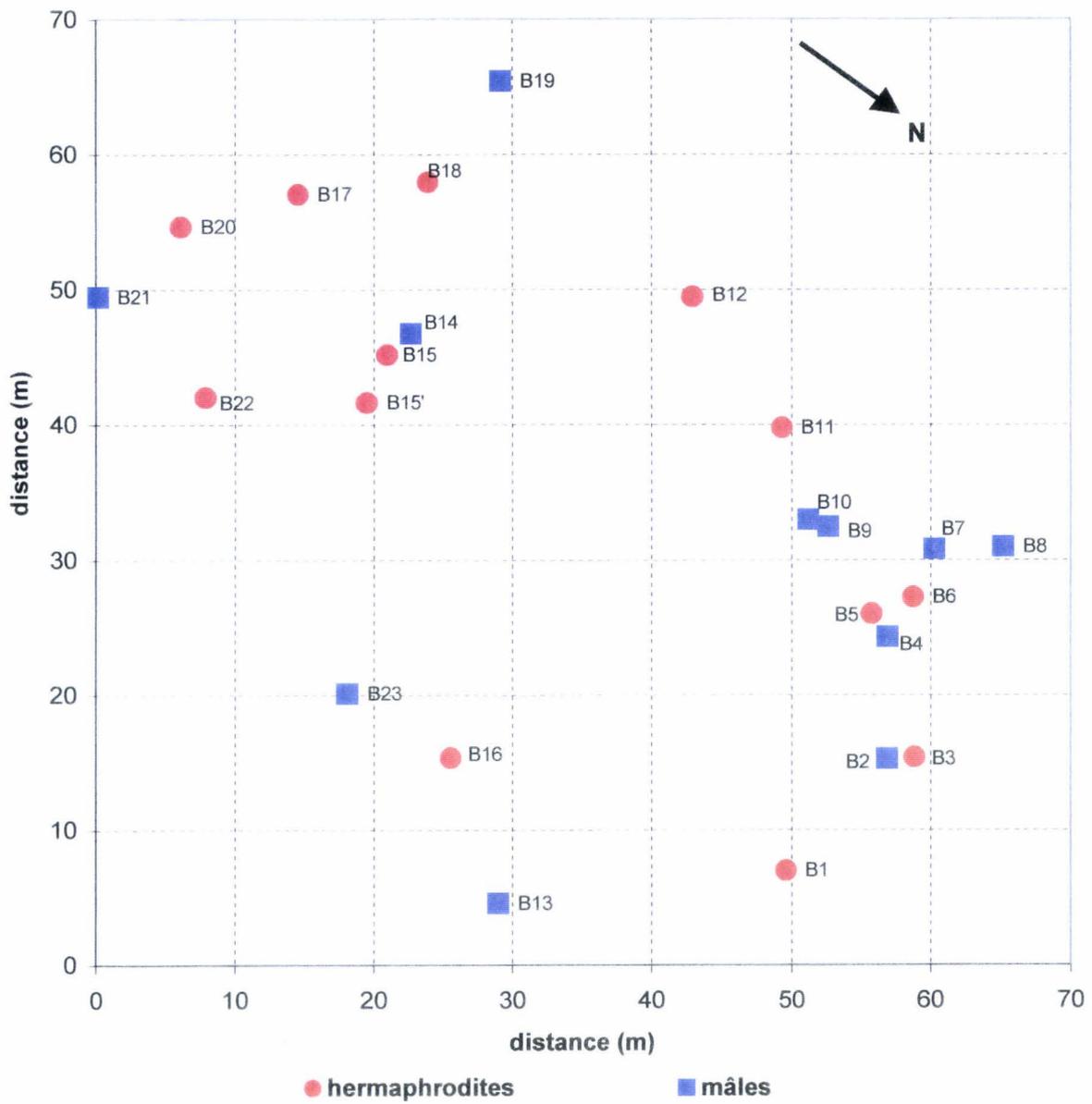


Figure 3.3. Carte de la population Salins B.

cryptique. Une estimation du succès reproducteur mâle réalisé en conditions naturelles par analyse de paternité est donc cruciale pour confirmer (ou infirmer) le statut androdioïque de *Phillyrea angustifolia*.

Pour mener à bien ces analyses, nous avons développé des marqueurs microsatellites. Ces marqueurs font l'objet depuis plusieurs années de l'attention croissante des biologistes des populations, qui voient en eux un outil idéal permettant notamment l'étude de flux de gènes et de succès reproducteur mâle en population (par ex. Jarne & Lagoda 1996).

Dans cette étude, nous avons donc analysé des descendances issues d'une population relativement isolée et de petite taille à l'aide de deux locus microsatellites (Saumitou-Laprade *et al.* 1999b), afin d'estimer en conditions naturelles et donc de compétition (1) la fertilité mâle des hermaphrodites, (2) l'avantage mâle ou succès reproducteur relatif des mâles, et (3) l'importance relative du phénotype sexuel et de la distance du donneur de pollen dans le succès reproducteur mâle. De plus cette étude nous permettra d'estimer le taux d'autofécondation des hermaphrodites.

Matériel et méthodes

Matériel biologique

La distribution de *Phillyrea angustifolia* s'étend considérablement en Camargue depuis ces cinquante dernières années (Strasberg 1988). Dans cette zone, deux types de populations sont rencontrées : (i) de grandes populations continues de plusieurs centaines d'individus, et (ii) de petites populations (quelques dizaines d'individus) limitées en surface car colonisant des zones d'étangs avec cordons littoraux où les seuls habitats disponibles sont de petites surfaces dunaires.

Afin de rendre plus robuste l'analyse de paternité, nous avons choisi de travailler sur une petite population au nombre de pères potentiels limité. La localisation de cette population appelée B est présentée sur la figure 3.2, qui indique de plus les positions des six peuplements de *P. angustifolia* les plus proches, ainsi que d'une population (appelée A) de 22 individus située à 330 m au Nord. Les peuplements les plus importants sont situés à 1,4 km au Nord de B (1: env. 500 ind.) et à 780 m au Sud (6). Les peuplements plus proches sont moins denses (3, env. 30 ind.; 4, env. 10 ind.; 5, env. 50 ind.). En outre, quelques individus se situent à env. 50 m à l'Est de B.

La population B est composée de 25 individus adultes, se répartissant en 11 mâles, 13 hermaphrodites et un individu non sexé (soit 45,8% de mâles dans cette population). La cartographie des individus de la population B est présentée en figure 3.3. La cartographie

précise des individus nous permet de calculer les distances entre les couples possibles d'individus donneurs et receveurs.

Les 13 hermaphrodites présents dans la population ont fructifié au cours de l'année 1997. Pour chacun d'entre eux, entre 60 et 250 fruits (chaque fruit ne contient qu'une graine) ont été récoltés, si possible dans les quatre directions Nord, Sud, Est et Ouest. Nous avons choisi de maximiser le nombre de descendants par mère à analyser (une centaine de descendants par mère) afin d'avoir la meilleure représentation possible des pères ayant pollinisé une mère donnée. Le tableau 3.1 présente pour chacun des individus hermaphrodite le nombre de fruits récoltés ainsi que le nombre de descendants pour lesquels l'ADN a été extrait en vue de l'analyse de paternité.

Tableau 3.1: Descendants récoltés sur les hermaphrodites de la population B, dans différentes directions.

	N	S	E	O	Total récolté	Total extrait
B1H	0	96	0	49	145	0
B3H	13	34	30	10	87	87
B5H	52	0	51	59	162	96
B6H	56	40	62	50	208	96
B11H	47	54	51	43	195	96
B12H	26	32	44	31	133	96
B15H	60	0	0	0	60	0
B15'H	51	45	47	0	143	96
B16H	0	50	50	61	161	0
B17H	58	76	51	65	250	96
B18H	63	41	60	60	224	96
B20H	43	66	59	62	230	96
B22H	58	47	0	62	167	96
Total					2165	951

Légende: N, S, E, O: descendants récoltés selon l'orientation sur le buisson; total extrait: nombre d'embryons dont l'ADN a été extrait. En gras, les hermaphrodites pour lesquels des descendants ont été analysés.

L'ADN a été extrait à partir des embryons : les fruits sont décortiqués, le noyau entouré d'un endocarpe lignifié peu épais est mis à imbiber sur boîte de Petri contenant du papier Whatman imbibé d'eau distillée pendant 24 à 48 h. Ces noyaux sont ensuite disséqués au scalpel, et l'embryon est extrait à la pointe fine ou à la pince fine.

L'extraction d'ADN est réalisée pour les parents à partir des feuilles; pour les descendants à partir des embryons (le protocole d'extraction utilisé est donné en annexe 2).

Encadré 3.1. Développement de marqueurs microsatellites chez *Phillyrea angustifolia* et polymorphisme au sein de deux populations

d'après Isolation of microsatellite loci for paternity testing in *Phillyrea angustifolia* L. (Oleaceae), P. Saumitou-Laprade, C. Vassiliadis, J.T. Epplen and C. Hardt, accepté dans *Molecular Ecology* (voir manuscrit en annexe 3).

- Criblage de la banque plasmidique (PuC19, fragments de 0,3 à 1,5 kb): 317 clones positifs sur 13 500 clones.
- Répartition des clones positifs selon les sondes utilisées : trois motifs prédominant, (AG)₈, (AAC)₅ et (TAA)₆TA.

13 sondes	(AG) ₈	(AAC) ₅	(TAA) ₆ TA	(CA) ₈	(GATA) ₄	(AT) ₁₂	(ACG) ₅	(GGAT) ₄	(GAA) ₅	(CAC) ₅	(CT) ₄ (CA) ₅	(GCC) ₅	(TAC) ₅
317 clones	90	81	49	16	14	13	12	10	9	8	8	4	3

- Polymorphisme sur 10 locus dans deux populations des Salins. Les populations analysées, A et B (voir Fig. 3.2), sont distantes de 330 m. Elles sont caractérisées respectivement par 22 et 25 individus et par 52,9% et 43,5% de mâles.

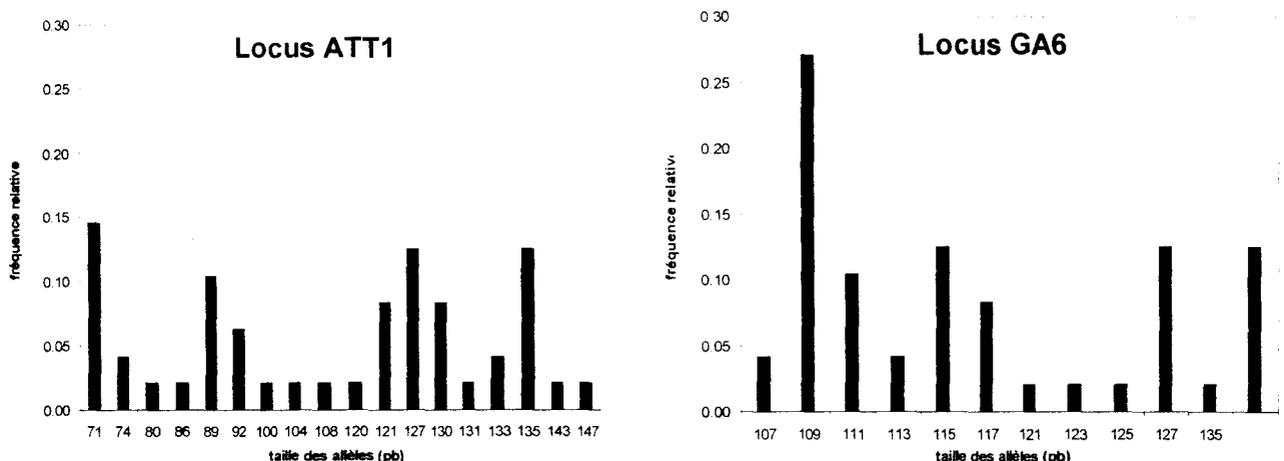
Locus	Motif	Gamme de tailles (bp)	Nb d'allèles	H _E	H _O	P	Nb d'individus testés
GA1	(AG) ₃₂	83-117	12	0.809	0.725	0.061	40
GA2	(GT) ₅ (GA) ₁₇	111-115	3	0.497	0.558	0.906	43
GA4	(AG) ₂₅	58-114	17	0.92	0.636	0.001	33
GA5	(GA) ₁₂	114-156	12	0.88	0.860	0.281	43
GA6	(GT) ₁₄ (GA) ₁₃	103-137	14	0.881	0.814	0.130	43
GA8	(AG) ₃₀	129-178	15	0.904	0.559	0.001	34
GA9	(GA) ₁₁	144-166	10	0.831	0.595	0.001	42
GA11	(GA) ₁₃	106-117	5	0.466	0.561	0.991	41
ATT1	(TTA) ₁₁	71-147	20	0.928	0.690	0.001	42
ATT2	(TAA) ₆	115-136	3	0.193	0.116	0.025	43

H_E : Hétérozygotie attendue; H_O : hétérozygotie observée; P: test d'adéquation à l'équilibre de Hardy-Weinberg

Les locus microsatellites sont très polymorphes dans ces deux populations. Par ailleurs, une faible structure génétique est mise en évidence ($F_{ST} = 0.0218$), bien que significative (test exact, $P < 0.001$).

- Choix des locus pour les analyses de paternité dans la population B : deux locus ont été retenus pour leur degré de polymorphisme et leur facilité de lecture, ATT1 et GA6 présentent respectivement 18 et 12 allèles dans la population B. Aucun déséquilibre de liaison statistiquement significatif n'a été mis en évidence.

Fréquences alléliques dans la population B pour les locus ATT1 et GA6



Recherche de marqueurs hypervariables chez Phillyrea angustifolia

Recherche d'empreintes génétiques par "oligonucléotide fingerprinting"

Ce type de marqueurs, d'abord mis au point chez les animaux, est maintenant utilisé chez les plantes. Il est fondé sur la présence dans le génome de courtes séquences répétées (Variable Nucleotide Tandem Repeat ou VNTR), réparties en structures complexes. Leur présence est visualisée par hybridation de petites sondes oligonucléotidiques correspondant au VNTR constitutif sur une membrane après digestion de l'ADN et transfert. Ce type d'approche a été développé avec succès au laboratoire GEPV chez trois autres espèces végétales avec la collaboration du Pr. J. T. Epplen à Bochum (Allemagne), *Sparganium erectum*, *Cynoglossum officinale* et *Beta vulgaris* (Piquot *et al.* 1996; Vrieling *et al.* 1997; Saumitou-Laprade *et al.* 1999a). Malgré le grand nombre de motifs testés (22 sondes oligonucléotidiques microsatellites, 3 enzymes de restrictions), aucun profil analysable n'a été obtenu chez *Phillyrea angustifolia* (Vassiliadis 1995; Saumitou-Laprade *et al.* 1999a). Cependant, la présence de forts signaux d'hybridation montrait l'existence de séquences microsatellites. Nous avons donc recherché de tels marqueurs, qui en outre présentaient l'avantage d'être codominants.

Recherche et tests de polymorphisme de marqueurs microsatellites (encadré 3.1)

Les microsatellites sont des séquences d'ADN très courtes, répétées en tandem un grand nombre de fois. Elles sont entourées de séquences flanquantes conservées permettant la définition d'amorces de 20-30 paires de bases. Ces amorces permettent l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de la région contenant le motif microsatellite. Les marqueurs microsatellites sont codominants et se caractérisent par une forte variabilité allélique. Le polymorphisme de taille du fragment amplifié correspond en première approximation à un polymorphisme pour le nombre de répétition du motif de base. L'importante variabilité obtenue est due à un fort taux de mutation, dans des régions du génome souvent non codantes et donc non soumises à une forte pression de sélection stabilisante.

L'encadré 3.1 ci-contre résume les résultats de l'article présenté en annexe 3 (Saumitou-Laprade *et al.* 1999b) concernant la recherche et le test de polymorphisme de locus microsatellites chez *Phillyrea angustifolia*.

Encadré 3.2 Méthode de test du maximum de vraisemblance par simulation développée dans le logiciel CERVUS [Marshall, 1998 #766]

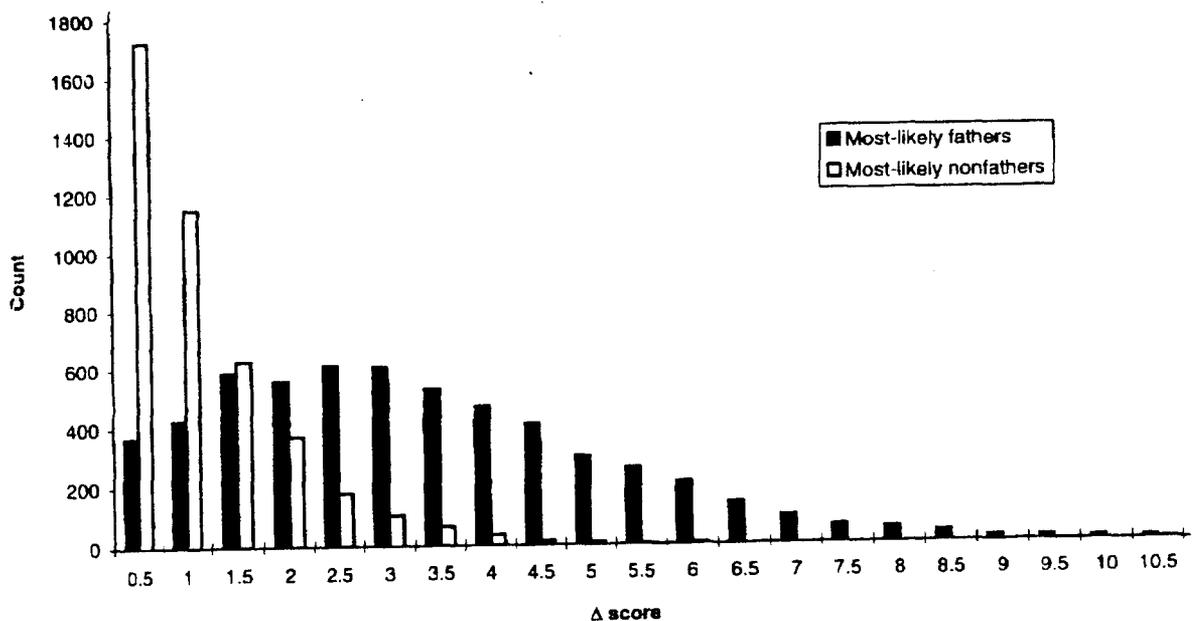
Les méthodes de maximum de vraisemblance désignent le père le plus vraisemblable. La différence entre les 'LOD score' des deux mâles les plus vraisemblables (ou Δ) sera d'autant plus forte que le mâle le plus vraisemblable est le vrai père.

Une simulation d'analyse de paternité est réalisée en se basant sur les fréquences alléliques observées dans la population (les parents). Pour chaque test de paternité simulé, le logiciel réalise les étapes suivantes:

- (1) il génère un génotype maternel et paternel, puis des génotypes de descendants de ce couple; et génère des génotypes de pères candidats non apparentés
- (2) il calcule le 'LOD score' de chaque père candidat et du vrai père ;
- (3) il trouve les deux pères les plus vraisemblables et calcule la différence de leur 'LOD score' (Δ).

Enfin, à partir de ces simulations, le logiciel calcule la distribution des 'LOD scores' pour les mâles qui étaient effectivement pères ('Most-likely fathers', avec des valeurs plutôt élevées), et pour les mâles qui ne l'étaient pas ('Most-likely non-fathers', avec valeurs plutôt basses).

Exemple : histogrammes des valeurs de Δ générées par simulation d'analyse de paternité en utilisant les paramètres d'une population de 'Rum red deer'[Marshall, 1998 #766]. En noir, nombre de cas où le mâle le plus vraisemblable est bien le vrai père ; en blanc, nombre de cas où le mâle le plus vraisemblable n'est pas le vrai père.



La comparaison des deux distributions permet de définir une valeur (minimum) de Δ au-delà de laquelle le père potentiel pour lequel on a trouvé cette valeur peut être considéré comme le vrai père à 80% ou à 95%.

Méthode d'analyse des descendance

Afin de déterminer le taux d'autofécondation, nous avons simplement comparé les génotypes maternels avec les génotypes des descendants et repéré les individus dont le seul père possible était la mère.

Afin d'inférer les paternités, nous avons utilisé une méthode de maximum de vraisemblance, avec le logiciel CERVUS (Marshall *et al.* 1998), qui permet de tester les différences de vraisemblance entre les deux pères les plus vraisemblables (voir encadré 3.2).

Résultats - discussion

Pouvoir résolutif des marqueurs

Unicité des génotypes parentaux

En prenant en compte les deux locus GA6 et ATT1, chaque parent a un génotype unique (voir tableau 3.2). Les marqueurs microsatellites se révèlent donc extrêmement résolutifs.

Une majorité de génotypes polliniques (haploïdes) produits par les individus de la population ne proviennent que d'un seul père possible (78% sur les 56 génotypes polliniques produits, tableau 3.3). Ceci permet une bonne attribution paternelle, et réduit les cas où plusieurs pères sont possibles.

Les allèles nuls

Le locus GA6 présente un allèle nul: à ce locus, la moitié de la descendance analysée de la mère B18H (génotype 137/137) possède l'allèle 137, l'autre moitié est homozygote pour un autre allèle et serait donc incompatible génétiquement avec la mère. Les allèles nuls sont une source d'erreur d'assignation fréquente et il est préférable d'écarter de l'analyse les locus en question (Pemberton *et al.* 1995). Ici, nous avons gardé le locus GA6 dans notre analyse en déterminant parmi les individus de la population ceux qui porteraient cet allèle; et nous avons codé les génotypes de ces individus et descendants issus de parents portant l'allèle nul, de façon à garder toute l'information apportée par ce locus. Nous avons écarté de l'analyse 23 descendants dont plusieurs pères possibles portaient l'allèle nul.

Au final, 742 descendants ont été analysés.

Tableau 3.2: Génotypes des parents mâles et hermaphrodites de la population B aux locus ATT1 et GA6.

	<i>Locus ATT1</i>		<i>Locus GA6</i>	
	Allèle1	Allèle2	Allèle1	Allèle2
Bxx	131	133	117	135
B1H*	89	92	109	109
B3H	71	130	107	117
B5H	71	130	113	117
B6H	121	130	109	127
B11H	135	143	123	137
B12H	71	89	109	137
B15H	71	147	107	127
B15'H	71	92	109	109
B16H	80	135	115	115
B17H	71	121	111	117
B18H*	104	135	137	137
B20H	127	127	109	121
B22H	127	135	125	137
B2M	89	92	109	115
B4M	71	121	109	109
B7M	121	127	109	115
B8M	108	120	111	113
B9M	127	127	115	127
B10M	74	133	127	127
B13M	74	86	111	127
B19M	100	130	109	115
B21M*	89	89	111	111
B23M	135	135	109	137

Légende: H: hermaphrodite; M: mâle; Bxx : ind non sexé; en gras: hermaphrodites mères des descendants analysés; * : individus portant vraisemblablement un allèle nul au locus GA6 (voir paragraphe allèle nul); B14M n'a pas été génotypé. Les chiffres indiquent la taille de chaque allèle en paires de bases.

Tableau 3.3. Répartition par nombre de pères possibles des 56 génotypes haploïdes du pollen produits par tous les individus génotypés de la population

Nb pères possibles	Nb génotypes polliniques
1	44
2	6
3	5
4	1
Total	56

Probabilité d'exclusion

La probabilité d'exclusion a été calculée pour chaque locus, et pour les deux locus, avec les données génotypiques des parents (en prenant en compte ou non l'allèle nul); ces résultats sont indiqués dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4. Probabilité d'exclusion aux locus ATT1 et GA6

	Locus	ATT1	GA6	GA6(AN)
Nb individus		24	24	24
Nb allèles		18	12	13
Nb hétérozygotes		20	17	20
H _o		0,833	0,708	0,833
H _e		0,931	0,875	0,891
PE		0,822	0,720	0,749
PE cumulée		0,9500		
PE cumulée (AN)		0,9552		

Légende: AN: en tenant compte de la présence d'allèle nul au locus GA6. PE: probabilité d'exclusion. H_o, H_e: hétérozygoties observée et attendue

Les marqueurs microsatellites utilisés ont un pouvoir d'exclusion très puissant; la valeur de 95% est en effet obtenue ici avec seulement deux locus. Chez *Quercus petraea* et *Q. robur*, avec 6 locus microsatellites (PE de 60 à 89% selon les locus), une PE de plus de 99.99% est obtenue. Ces valeurs sont nettement supérieures à celles généralement obtenues avec des marqueurs enzymatiques. A titre de comparaison, chez *Asclepias exaltata*, 16 locus enzymatiques sont nécessaires pour obtenir une PE variant de 81 à 92% (Broyles *et al.* 1994); chez *Pseudotsuga menziesii*, avec 11 locus enzymatiques, la PE moyenne sur plusieurs voisinages est de 0,756 (de 0,648 à 0,894 selon le voisinage) (Burczyk & Prat 1997), chez *Cecropia obtusifolia*, avec 8 locus enzymatiques la PE globale est de 0,923 (PE varie de 0,038 à 0,532 selon les locus) (Kaufman *et al.* 1998).

Taux d'autofécondation

La comparaison des génotypes maternels et des génotypes des descendants a permis d'estimer le taux d'autofécondation (tableau 3.5). Des descendants issus d'autofécondation ne sont observés que sur 5 des 10 mères analysées; le taux d'autofécondation moyen sur l'ensemble des mères est très faible (0.67%). De plus, cette valeur est certainement surestimée car des donneurs polliniques de même génotype que ces mères pourraient être présents à proximité de la population B ou bien pourraient correspondre au mâle B14M non typé au sein de B. Par

ailleurs, ces estimations sont cohérentes avec les résultats d'études préliminaires (données non présentées) réalisées sur quatre hermaphrodites de cette population (B5H, B6H, B16H, B17H) pour lesquels le nombre de fruits par inflorescence a été compté sur deux rameaux ensachés (autopollinisation), et deux rameaux témoins (pollinisation libre). Respectivement 0,036 (0,050) et 2,857 (1,059) fruits par inflorescence en moyenne ont été obtenus, soit un rapport de 0,0126 (soit 1,26%). Ces résultats confirment donc l'autoincompatibilité trouvée dans l'étude précédente (voir Chapitre 2 ; Vassiliadis *et al.* accepté).

Tableau 3.5: Les descendants potentiellement issus d'autofécondation (seul père possible: la mère) pour chaque famille, et le taux d'autofécondation estimé.

mère	Nb desc 2 locus	Nb desc. issus d'autofécondation	Taux d'autofécondation (%)
B3H	77	1	1,30
B5H	75	1	1,33
B6H	65	1	1,54
B11H	78	0	0,00
B12H	86	1	1,16
B15'H	67	0	0,00
B17H	68	0	0,00
B18H	76	0	0,00
B20H	77	0	0,00
B22H	73	1	1,37
Total	742	5	0,67

Nos estimations sont voisines des taux d'autofécondations estimés chez les espèces ligneuses anémophiles, fortement allogames: chez *Pseudotsuga menziesii*, sur 94 mères avec 11 locus enzymatiques: 3 à 4% selon la méthode employée ('mixed mating' ou voisinage) (Burczyk & Prat 1997); chez *Pinus attenuata* sur 4 mères avec 11 locus enzymatiques, 3 à 4% également, (Burczyk *et al.* 1996); chez *Quercus robur*, sur 6 mères 2% et chez *Q. petraea*, sur 7 mères 1% avec 6 locus microsatellites (Streiff 1998).

Flux de gènes extra - population.

Si tous les donneurs polliniques d'une population sont typés, le nombre de descendants pour lesquels aucun père de la population n'a pu être assigné représente une estimation minimum du flux de gènes venant de l'extérieur de la population (voir tableau 3.6). Dans notre cas, cette valeur inclut également la contribution éventuelle du mâle B14M.

Tableau 3.6: Taux de paternité hors population (inclus B14M) par famille.

Famille	2 locus	OP	% exclusion
B3	77	35	45,45
B5	75	42	56,00
B6	65	24	36,92
B11	78	39	50,00
B12	86	42	48,84
B15'	67	11	16,42
B17	68	32	47,06
B18	76	30	39,47
B20	77	38	49,35
B22	73	30	41,10
Total	742	323	43,06

Légende: OP: descendants pour lesquels aucun père n'a été trouvé dans la population.

Ces flux sont très importants, ils représentent en moyenne 43% des descendants analysés sur toutes les mères. Bien qu'une part de ces 43% puisse être attribuée à B14M, il est vraisemblable que cet individu ne contribue pas à la totalité de ces descendants. En effet, les attributions de paternité (voir tableau 3.8 et paragraphe correspondant) montrent que chaque mâle contribue en moyenne pour 5% des descendants (=215/410) atteignant une valeur maximale de 11,7% (=48/215) pour B10M. Par ailleurs, ce résultat est en adéquation avec la faible valeur de F_{ST} entre les populations A et B trouvée sur 10 locus (encadré 3.1), qui laissait supposer l'existence d'importants flux de gènes entre ces deux populations. Enfin, soulignons que d'autres peuplements de *P. angustifolia* se situent non loin de la population B étudiée (populations 1 à 6, Fig. 3.2) et sont donc susceptibles d'avoir participé à ce flux de pollen extérieur. Dans cette région, le vent dominant venant du Nord a pu faciliter ce transfert de pollen.

Chez d'autres espèces anémophiles, les flux de pollen extérieurs à la parcelle étudiée sont du même ordre de grandeur : par ex., chez *Pinus attenuata* et *Pseudotsuga menziesii*, respectivement 56% et 54% des descendants analysés sont issus de pères situés hors du voisinage de la mère (Burczyk *et al.* 1996 ; Burczyk & Prat 1997) ; chez *Quercus robur* et *petraea*, 47% à 81% selon la mère, avec une moyenne de 65% pour *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. et 69% chez *Quercus robur* L (Streiff *et al.* 1999).

Les attributions de paternité

Il s'agit à présent de déterminer les paternités au sein de la population, avec deux possibilités: soit le père est un mâle, soit il est hermaphrodite.

Les taux d'autofécondation étant très faibles (moins de 1%), nous avons réalisé l'analyse de paternité en fixant comme pères potentiels pour chaque descendant tous les individus de la

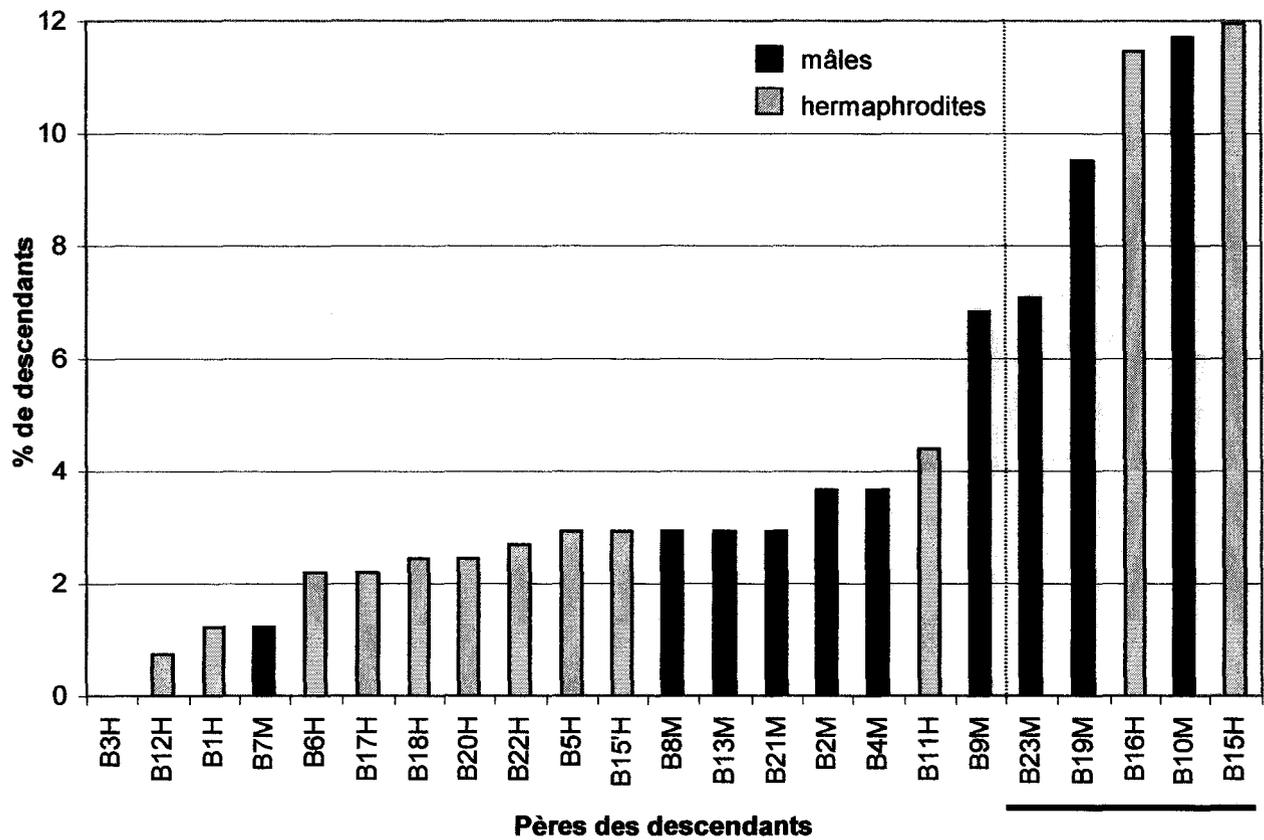


Figure 3.4. Succès reproducteur mâle des individus de la population B. Le trait en pointillé indique la médiane : seuls 5 individus sont pères de 50% des descendants étudiés (N=410).

population sauf sa mère et B14M (de génotype inconnu). Au total, sur les 742 individus génotypés aux deux locus, nous avons pu attribuer un père pour 419 (au seuil 80%, dont 264 au seuil 95%), soit 56,47% d'entre eux (tableau 3.7). La suite des analyses porte sur ces

Tableau 3.7. Nombre de descendants pour lesquels un père a été trouvé par la méthode de maximum de vraisemblance par CERVUS v. 1.0 (Marshall *et al.* 1998).

Famille	2 locus	seuil 95%	seuil 80%
B3	77	22	42
B5	75	15	33
B6	65	26	41
B11	78	23	39
B12	86	26	44
B15'	67	48	56
B17	68	19	36
B18	76	32	46
B20	77	21	39
B22	73	32	43
Total	742	264	419

Légende: seuil: voir méthode.

descendants (nous ne prendrons pas en compte les 5 descendants issus d'autofécondation par la suite). Comme pour les taux d'autofécondation, ces résultats pourraient être légèrement modifiés (père attribué et/ou nombre de descendants pour lesquels un père est attribué) avec la prise en compte du mâle B14M. Cependant, le niveau de polymorphisme des marqueurs utilisés est tel que, dans près de 80% des cas, un seul individu correspond à un génotype pollinique donné (tableaux 3.2 et 3.3). Ce seul individu B14M ne peut donc se substituer comme père réel à l'ensemble des autres individus de la population, notamment des 12 individus hermaphrodites qui s'avèrent être des pères (voir paragraphe suivant et tableau 3.8).

Le succès mâle des hermaphrodites

Les fécondations réalisées (nombre de descendants) sont données dans le tableau 3.8 pour chaque couple mère-père de la population (les descendants issus d'autofécondation ne sont pas représentés).

Les individus hermaphrodites participent pour une grande part dans la paternité des descendants analysés: au total, les 13 pères hermaphrodites ont produit 195 descendants, soit près de la moitié (46,5%) du total des 410 descendants analysés (tous sauf ceux de B** non

sexé, tableau 3.8). Le succès reproducteur moyen par père hermaphrodite est de 15 descendants (écart-type 15,31).

Sur la figure 3.4, le succès reproducteur mâle de chaque père est donné en pourcentage de l'ensemble des 410 descendants. Le seul individu qui n'a produit aucun descendant par voie mâle est un hermaphrodite, B3H ; cependant, les potentiels receveurs les plus proches sont B6H, qui est fécondé par 4 individus proches (voir carte Fig. 3.3), et les individus B1H et B16H sur lesquels aucun descendant n'a été analysé.

La moitié des descendants est produite par cinq individus, dont deux hermaphrodites. Ceci confirme que cette espèce n'est pas subdioïque, mais bien fonctionnellement androdioïque en population naturelle.

L'avantage mâle et la variance du succès reproducteur

Les dix individus mâles de génotype connu ont contribué à 215 descendants, soit un succès reproducteur moyen de 21,5 descendants par père mâle (écart-type de 13,88, CV 64,6%, tableau 3.9). Il n'est pas significativement différent de celui des hermaphrodites (test F).

L'avantage mâle estimé (ratio des succès reproducteurs mâle et hermaphrodites) est de 1,43; nous obtenons donc le même ordre de grandeur que lors des pollinisations contrôlées (1,93, sur d'autres individus, et avec des pollinisations utilisant un seul donneur, voir chapitre 2, Vassiliadis *et al.* accepté). La figure 3.4 montre en effet une très grande variance du succès reproducteur, en particulier pour les hermaphrodites dont le succès reproducteur varie entre 0% et 11.7% des descendants étudiés. Ce résultat correspond à ce qui a été trouvé au Chapitre 2 ; il est également comparable aux valeurs de 0,6% à 12,8% obtenues chez les espèces anémophiles allogames *Q. robur* et *Q. petraea* (Streiff 1998).

Tableau 3.8. Nombre de descendants observés pour chacun des couples père-mère de la population.

Mères	B3H	B5H	B6H	B11H	B12H	B15'H	B17H	B18H	B20H	B22H	Total par père	Nb H
<i>Pères</i>												
B**		2	3	1			1		2		9	5
B1H	4									1	5	2
B3H											0	0
B5H	2		8		1				1		12	4
B6H	1	1			1	1	2	1	2		9	7
B11H					1	2	1	4	1	9	18	6
B12H		1		1					1		3	3
B15H	2		1	4		33	3	2	1	3	49	8
B15'H	4		1	2	2			1	2		12	6
B16H	3	2	4	4	8	2	8	6	8	2	47	10
B17H		1	2							6	9	3
B18H		1	1	2		1	1			4	10	6
B20H		6			2			1		1	10	4
B22H	3	1	1	1	3			1	1		11	7
<i>Sous total hermaphrodite</i>	<i>19</i>	<i>13</i>	<i>18</i>	<i>14</i>	<i>18</i>	<i>39</i>	<i>15</i>	<i>16</i>	<i>17</i>	<i>26</i>	195	
<i>Sous mâle</i>												
B2M	3			2	5		2	1	1	1	15	7
B4M	4	1	2			2	1		3	2	15	7
B7M			4						1		5	2
B8M		3				6			3		12	3
B9M	4	3	4	5	5		3	1	1	2	28	9
B10M	2	8	3	5	5	4	5	7	3	6	48	10
B13M	2		2	3	1	4					12	5
B19M	1		3	1	2		8	17	7		39	7
B21M	5			3	1					3	12	4
B23M	1	3	2	5	7	1	2	3	3	2	29	10
<i>Sous total mâle</i>	<i>22</i>	<i>18</i>	<i>20</i>	<i>24</i>	<i>26</i>	<i>17</i>	<i>21</i>	<i>29</i>	<i>22</i>	<i>16</i>	215	
Total (M et H) par mère	41	33	41	39	44	56	36	46	39	44	410	

Légende: Nb H: nombre d'hermaphrodites de la population fécondés par chaque père.

Tableau 3.9. Succès reproducteur mâle moyen estimé des mâles et des hermaphrodites.

	Nb total de descendants	Moyenne (ET)	Nb H moyen (ET)
sur 13 H	195	15,00 (15,31)	5,08 (2,72)
sur 10 M	215	21,50 (13,88)	6,40 (2,84)
Avantage M		1,43	1.26

Légende: ET: écart-type; Nb H moyen: nombre moyen de mères hermaphrodites fécondées par les mâles et les hermaphrodites.

Des études menées sur différentes espèces d'arbres ont mis en évidence des relations entre la variance du succès reproducteur et des facteurs biologiques ou écologiques (Schoen & Stewart 1986) (Burczyk & Prat 1997) (Kaufman *et al.* 1998), (Erickson & Adams 1989; Burczyk *et al.* 1996). Ainsi chez *Pseudotsuga menziesii*, des données sur la phénologie, la distance et la direction incorporées à un modèle de maximum de vraisemblance ont montré que ces facteurs avaient un effet significatif (Burczyk & Prat 1997). Les facteurs biologiques prépondérants sont la fertilité des individus (production de pollen ; (Schoen & Stewart 1986)), les synchronisations phénologiques (chevauchement et durée des phases de production pollinique des donneurs et de réceptivité de l'individu receveur ; (Erickson & Adams 1989)), ou encore des effets plus spécifiques tels la hauteur des individus donneurs (Burczyk *et al.* 1996). Des effets post-zygotiques comme la dépression de consanguinité peuvent également intervenir. Chez *P. angustifolia*, nous ne disposons pas encore de données permettant de discuter de l'importance de ces différents facteurs pour expliquer les hétérogénéités observées sur notre étude de la population B. En revanche, nous disposons de données sur la distance et la disposition des individus mâles, deux facteurs écologiques ayant également d'importants effets (Kaufman *et al.* 1998), (Burczyk & Prat 1997).

L'effet de la distance entre parents

Nous avons calculé le nombre de couples possibles père-mère pour chacune des classes de distances: nous obtenons ainsi une matrice de succès potentiel (tableau 3.10). Le nombre de descendants effectivement obtenu pour chaque couple a également été reporté par classe de distance (tableau 3.11). Les succès reproducteurs observés et attendus en fonction des classes de distances séparant les couple père-mère sont représentés Figure 3.4.

Tout d'abord, si l'on choisit la médiane (37 m) comme limite de deux classes de distances (0-35 m et 35-70 m), les effectifs attendus et observés dans ces deux classes ne diffèrent pas significativement (test G, 1 ddl, $P=0.999$); le résultat est le même en ne considérant que les croisements issus de mâles ou d'hermaphrodites (Fig. 3.5 B et C). On ne retrouve pas ici la distribution classique attendue, avec un fort effet à courte distance et un très faible taux de fécondations à plus longue distance. De tels effets sont observés dans d'autres études récentes

Tableau 3.10: Nombre de couples possibles en fonction des classes de distance séparant les pères (13 hermaphrodites, 10 mâles) et les mères (10 hermaphrodites receveurs) (matrice du succès reproducteur mâle attendu).

Classes de distance*	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	Total par père**
pères															
B1H			1	1	1		1		1	1	1	1	2		10
B3H			2			1		1		1		2	1	1	9
B5H	1		1	1		1		1		1	2	1			9
B6H	1		1	1		1			1	1	2	1			9
B11H			1	2		2	1	1	1	1					9
B12H			1		2	3		3							9
B15H	1		3	1	1	1		1	1	1					10
B15'H			1	3	1	1		1	1	1					9
B16H						1	4	2	3						10
B17H		2		2		1		1			2		1		9
B18H		1		2	2		1			2		1			9
B20H		1	1	2				1		1		2		1	9
B22H			2	1	1			1	1		2	1			9
Sous total hermaphrodite	3	4	14	16	8	12	7	13	9	10	9	9	4	2	120
pères															
B2M	1		2			1		1		1	1	2	1		10
B4M	2	1		1		1			1	1	2	1			10
B7M	1	1	1	1		1			1	1	2	1			10
B8M		1	1	2		1				2		2	1		10
B9M		3		2			1	1		2	1				10
B10M		3		2			1	1	2		1				10
B13M							2	2	2	1	2	1			10
B19M		1		1	1	2	2			2		1			10
B21M		1	1	1	1	1			1		1		2	1	10
B23M					2			6	2						10
Sous total mâle	4	11	5	10	4	7	6	11	9	10	10	8	4	1	100
Total par classe de distance	7	15	19	26	12	19	13	24	18	20	19	17	8	3	220

* Les classes de distances sont indiquées par la valeur supérieure de l'intervalle considéré.

** Pour chaque hermaphrodite receveur, il n'y a que 9 autres receveurs possibles.

Tableau 3.11: Nombre de descendants effectivement observés dans chacune des classes de distance qui sépare ses parents, père et hermaphrodite receveur (matrice du succès reproducteur mâle observé).

Classes de distance	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	Total par père
pères															
B1H			4	0	0		0		0	0	1	0	0		5
B3H			0			0		0		0	0	0	0	0	0
B5H	8		2	0		1		0		0	0	1			12
B6H	1		1	0		1			1	1	2	2			9
B11H			1	0		2	4	1	9	1					18
B12H			1		0	1		1							3
B15H	33		8	1	0	4		0	1	2					49
B15'H			0	3	2	2		0	1	4					12
B16H						2	11	12	22						47
B17H		0		6		0		0			3		0		9
B18H		1		1	4		2			2		0			10
B20H		0	1	1				2		0		6		0	10
B22H			1	0	1			3	1		2	3			11
Sous total hermaphrodite	42	1	19	12	7	13	17	19	35	10	8	12	0	0	195
pères															
B2M	3		0			2		5		0	1	3	1		15
B4M	3	4		0		0			2	0	3	3			15
B7M	4	0	0	0		0			0	0	0	1			5
B8M		0	3	0		0				6		0	3		12
B9M		12		9			0	1		5	1				28
B10M		16		7			4	7	11		3				48
B13M							2	6	3	1	0	0			12
B19M		17		8	2	7	1			3		1			39
B21M		0	3	0	0	0			1		3		0	5	12
B23M					3			23	3						29
Sous total mâle	10	49	6	24	5	9	7	42	20	15	11	8	4	5	215
Total par classe de distance	52	50	25	36	12	22	24	61	55	25	19	20	4	5	410

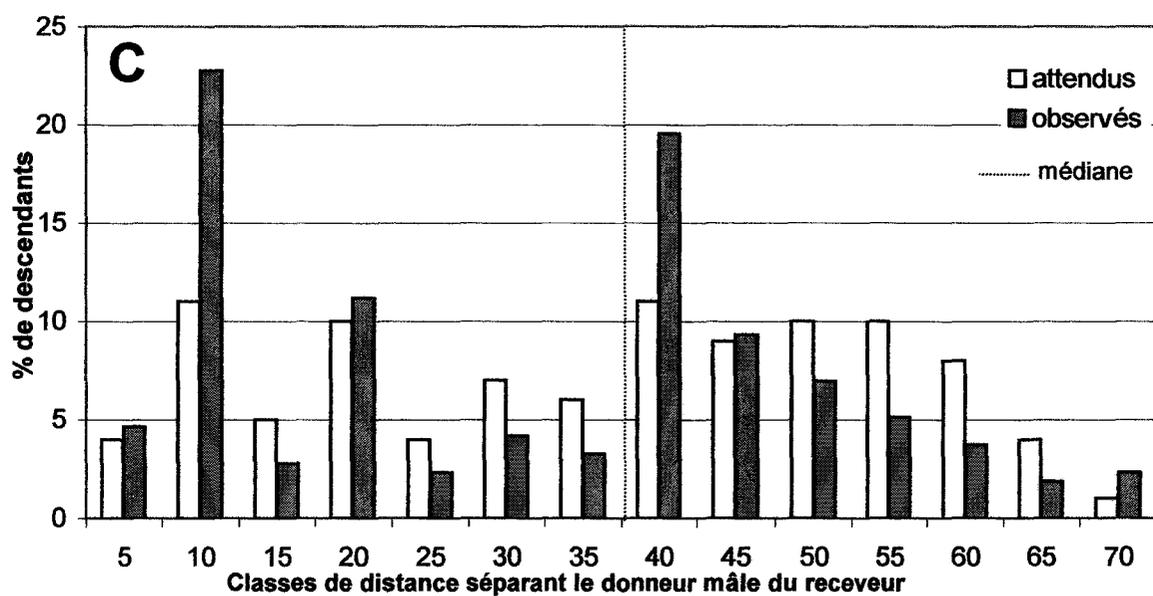
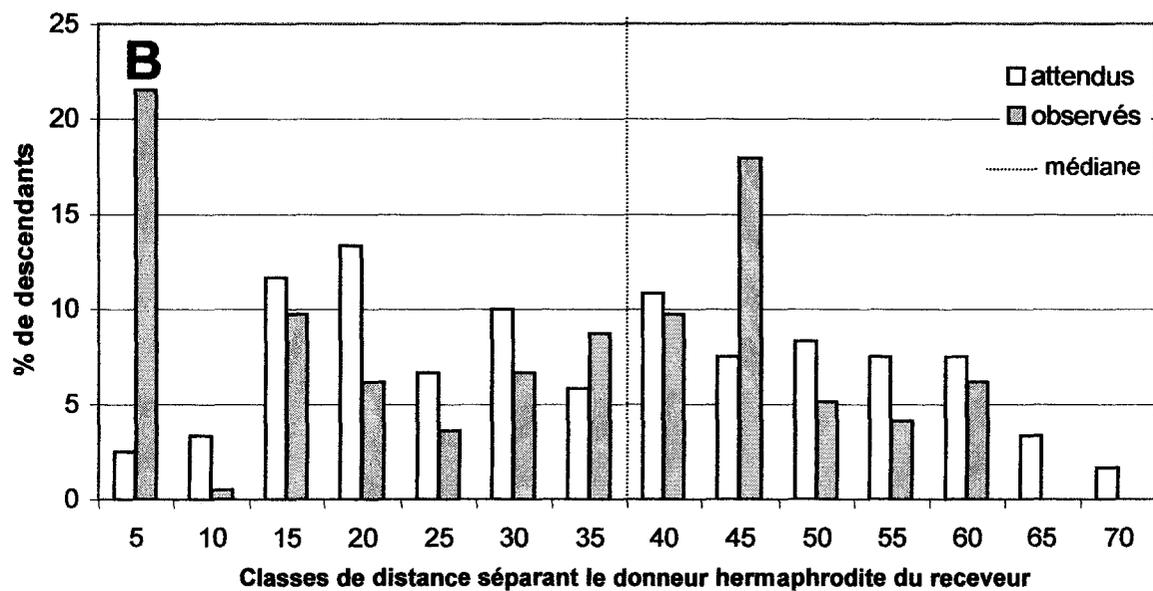
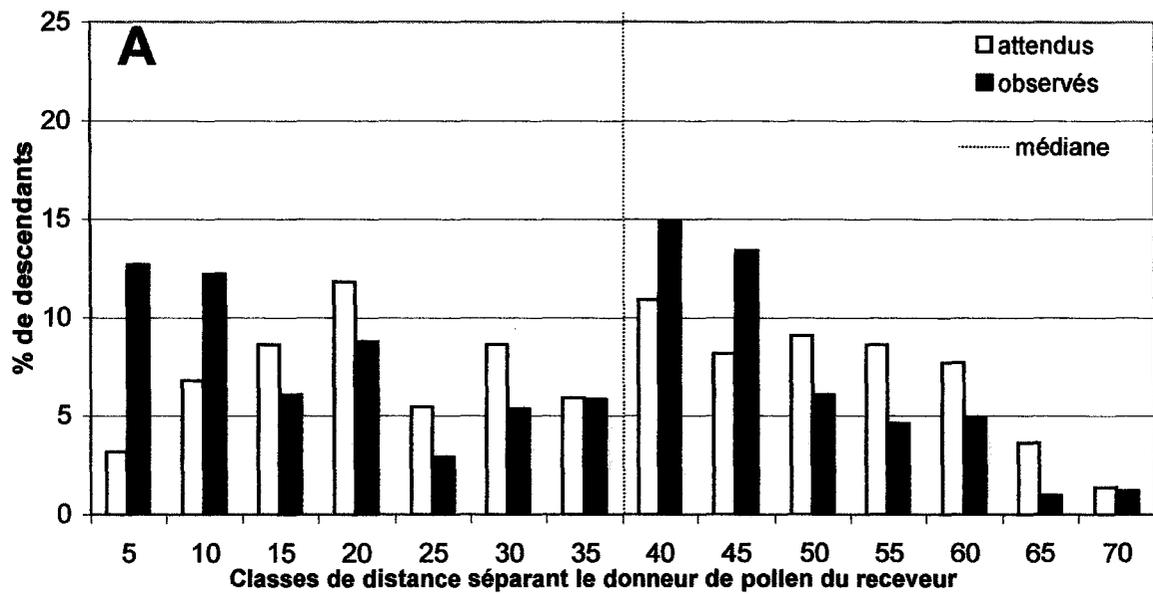


Figure 3.5. Comparaison de la distance de fécondation attendue et observée. A. Tous donneurs confondus; B. Donneurs hermaphrodites; C. Donneurs mâles.

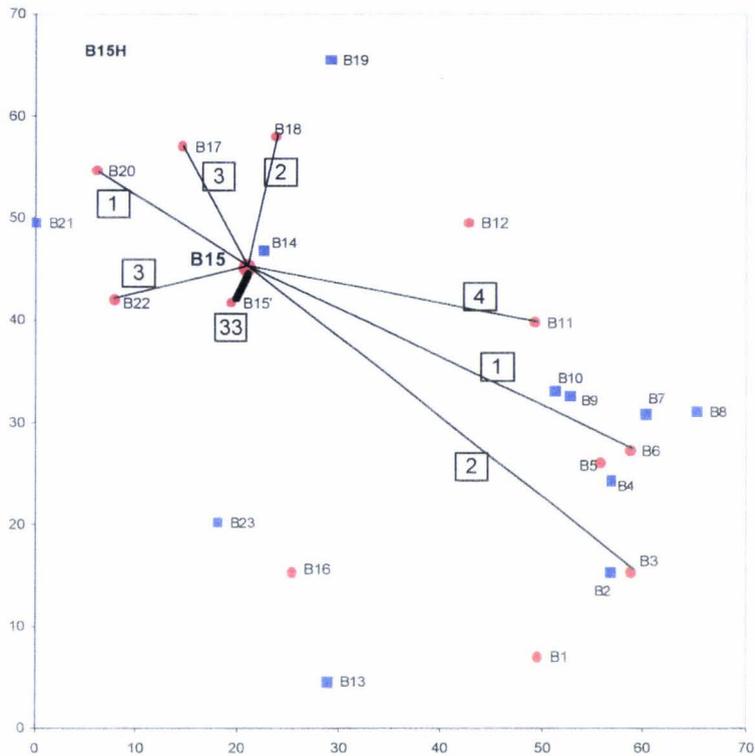


Figure 3.6. Carte de flux de pollen réalisé pour le donneur B15H (N = 49 descendants). Les traits relient le donneur avec chaque receveur où ses descendants ont été trouvés (nombre de descendants encadré).

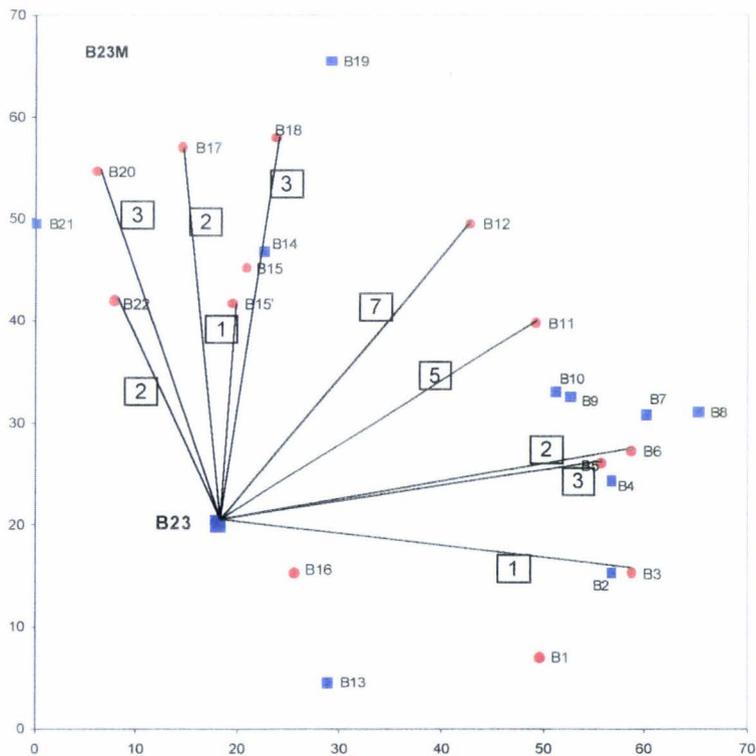


Figure 3.7. Carte de flux de pollen réalisé pour le donneur B23M (N = 29 descendants)

sur les distances de dispersions des gamètes mâles intra-population (Engel *et al.* 1999; Streiff *et al.* 1999). Une explication possible à nos résultats est que la population B étudiée est petite et de faible densité, de sorte que des croisements aléatoires se produisent à l'échelle de la population ; en choisissant une grande population continue, des effets distance pourraient être mis en évidence.

Deux 'pics' sont observés, à courte distance et à plus longue distance, ce qui explique que si l'on considère toutes les classes de distances, la différence entre effectifs attendus et observés est significative ($P < 0,0001$), et ce pour tous les donneurs confondus (histogramme A) ou pour les deux sexes pris séparément (histogrammes B et C).

(1) A courte distance (<10 m), les succès reproducteurs observés sont beaucoup plus élevés que les succès attendus. Cet effet est dû principalement à deux couples d'individus très proches donnant plus de 10 descendants, le donneur de pollen pouvant être mâle ou hermaphrodite: B15'H (mère) x B15H (père) (33 descendants; voir la répartition des 49 descendants du père B15H sur la figure 3.6) et B18H (mère)x B19M (père) (17 descendants). Ce fort effet peut être dû à une saturation du receveur par un donneur proche et de phénologie synchrone.

(2) A moyenne distance (35-45 m), de nouveau les succès reproducteurs observés sont en excès. Là aussi, une analyse plus fine montre que deux individus donneurs sont impliqués principalement: B16H et B23M (voir la répartition des 29 descendants issus de B23M sur la figure 3.7). Le donneur se trouve situé à égale distance de sept hermaphrodites receveurs. La situation par rapport aux hermaphrodites receveurs, et la phénologie (synchronisation) sont ici des paramètres essentiels; même à relativement longue distance un individu peut maximiser son succès reproducteur pourvu qu'il trouve suffisamment de receveurs réceptifs.

L'effet de la direction

Les origines paternelles des descendances de chaque hermaphrodite receveur sont représentés (Fig. 3.8). Les effets directions sont difficiles à détecter à cause de la répartition des hermaphrodites receveurs en périphérie de la population. Cependant, un effet direction Nord-Sud est possible, et serait dû à l'orientation principale des vents, mais nous ne l'avons pas encore testé. De tels effets ont été mis en évidence par des modèles de maximum de vraisemblance chez *Pinus attenuata* (Burczyk *et al.* 1996).

Figure 3.8: Cartes de flux de pollen réalisé pour chaque hermaphrodite receveur.

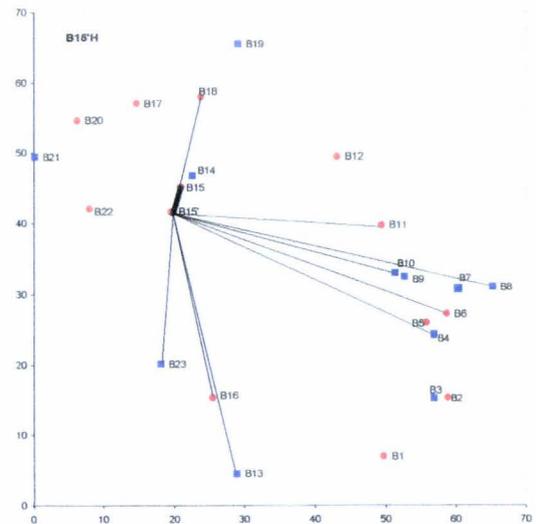
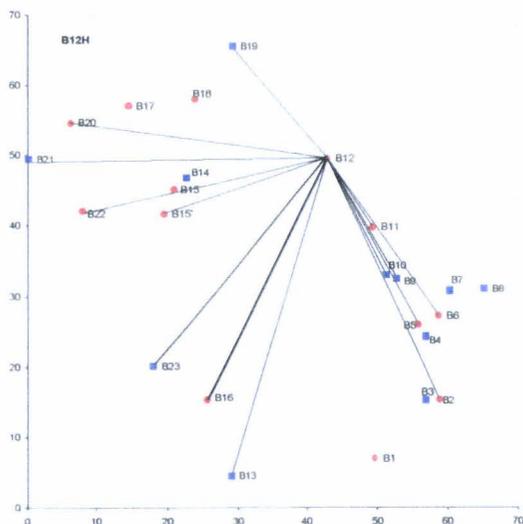
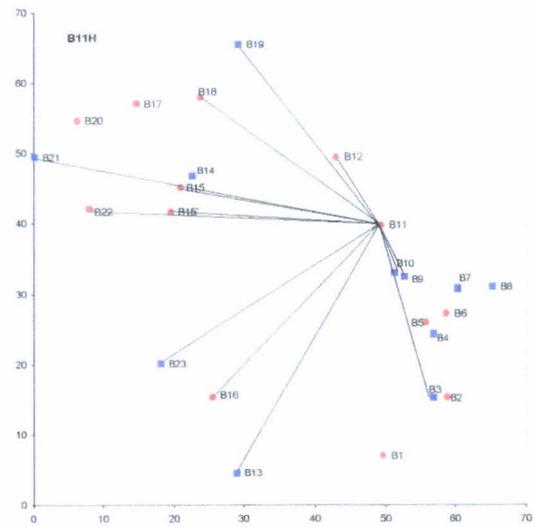
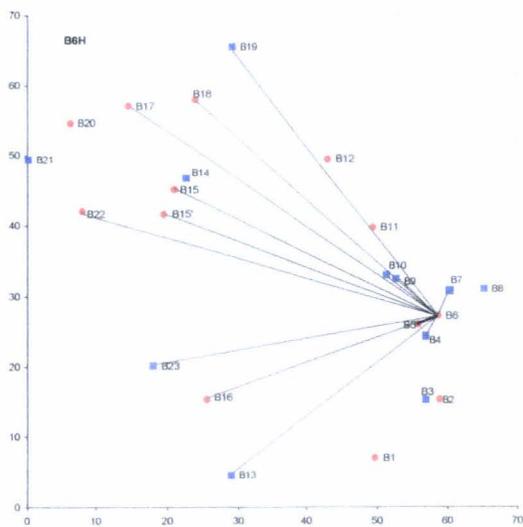
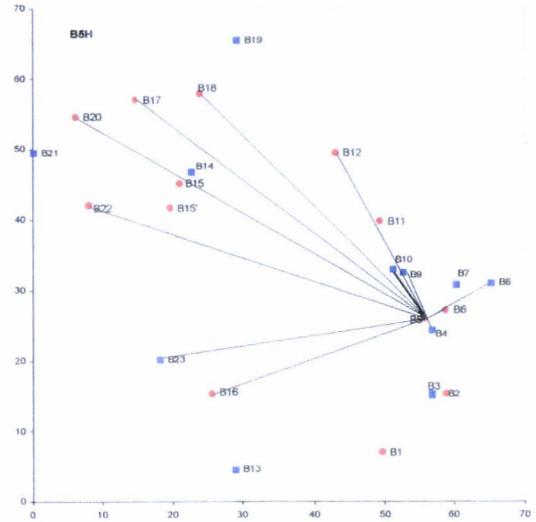
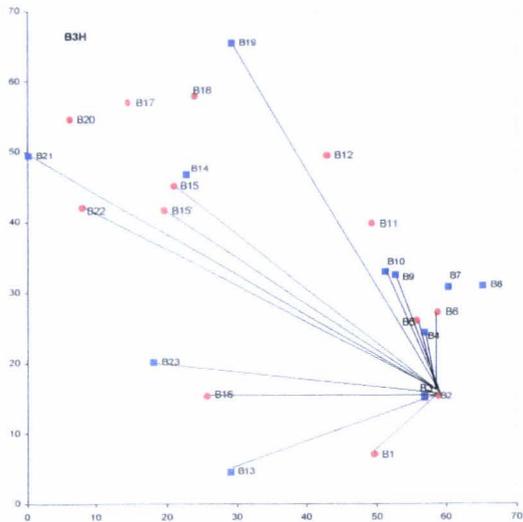
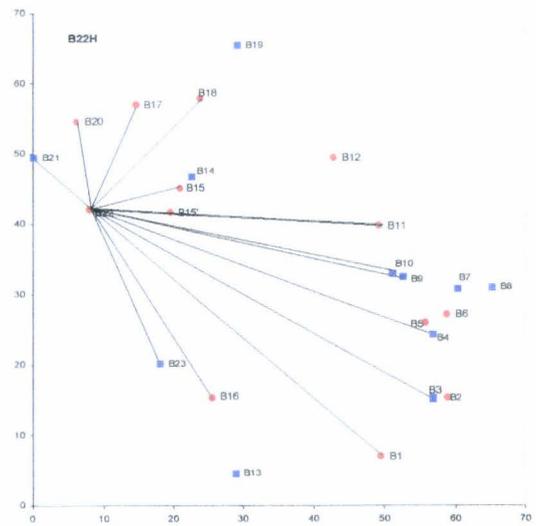
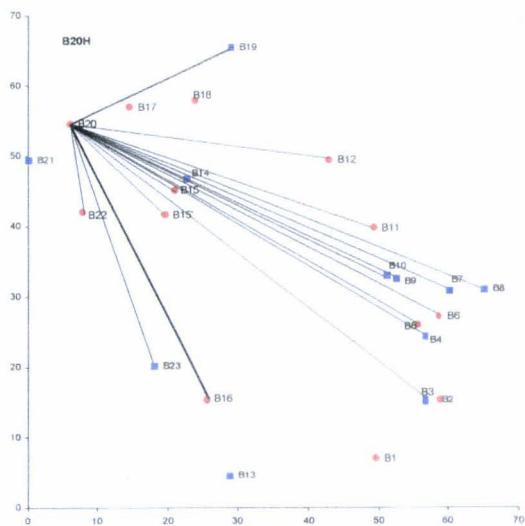
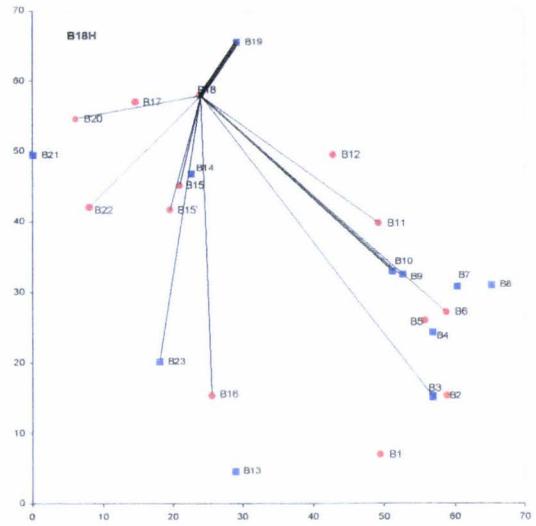
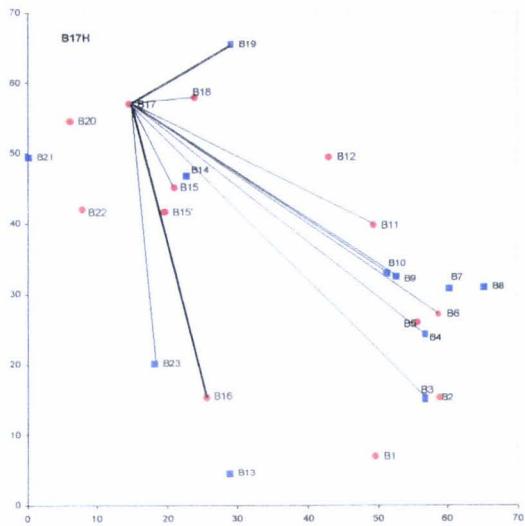


Figure 3.8 (suite et fin)



Conclusions

L'étude du système de reproduction des individus d'une population naturelle du sud de la Camargue par analyse de paternité des descendants à l'aide de marqueurs microsatellites nous a permis de montrer les résultats suivants :

1. Les hermaphrodites sont bien fonctionnels en tant que mâles en conditions naturelles. L'espèce est bien fonctionnellement androdioïque.
2. Les mâles sont globalement plus efficaces que les hermaphrodites (avantage mesuré de 1,4), mais cet avantage n'est pas significatif à cause de la très forte variance observée.
3. L'espèce est bien fortement allogame.

Les trois principaux résultats des analyses en croisements contrôlés (Chapitre 2) se trouvent confirmés en population naturelle, en pollinisation libre.

Cependant, plusieurs aspects restent à explorer. D'une part, les succès reproducteurs mâles sont estimés ici sur des descendants au stade embryon. Les effets pré-zygotiques, tels la fertilité potentielle des individus (voir Encadré 2, en Introduction), la phénologie, et l'incompatibilité entre individus sont pris en compte dans cette estimation. Les effets post-zygotiques, comme la dépression de consanguinité ou effets de sélection ne sont pas inclus (des mesures de germination et de viabilité des descendants restent à effectuer sur les descendances des plantules). Les effets post-zygotiques peuvent influencer le degré de la viabilité comparée des descendants issus de mâles ou d'hermaphrodites.

D'autre part, il serait intéressant de confronter les résultats obtenus avec une situation écologique différente, comme une grande population continue. En effet, nous avons montré l'existence d'un important flux de pollen extérieur à la population (43% des descendants analysés ont un père hors de la population), et à cela s'ajoutent des dispersions de pollen efficaces à longues distances intra-population (un pic à 35-40 m, et des dispersions jusqu'à 70 m). Des effets leptokurtiques pourraient être observés sur des populations continues et de plus grande taille ; mais dans ce cas, l'augmentation du nombre de pères potentiels réduirait alors la puissance de l'analyse, et il faudrait augmenter en conséquence le nombre de marqueurs utilisés. Nous disposons en effet de 8 autres marqueurs polymorphes (Encadré 3.1). Par ailleurs, la présence d'allèles nuls au locus GA6 nous pousse également à faire ces analyses sur la population B avec de nouveaux locus.

Ensuite, le seul individu sans descendance par la voie mâle est un individu hermaphrodite (B3H). Cet individu pourrait être mâle-stérile, au contraire de tous les autres hermaphrodites présents dans la population, ou bien il pourrait avoir fécondé B1H et B16H qui étaient proches mais sur lesquels aucun descendant n'a été analysé. Des descendants sont disponibles et seront prochainement analysés afin de vérifier ces hypothèses. Il conviendra également de

reprendre les analyses conduites dans la population B après avoir typé le mâle B14M, pour lequel l'ADN n'était pas disponible dans le cadre du travail conduit pour cette thèse. Enfin, des modèles intégrant les facteurs biologiques, comme la phénologie (recouvrements phénologiques entre individus), l'âge des individus, et écologiques, comme la direction des pollinisateurs, sont à développer chez *P. angustifolia* compte-tenu de l'importante variance de succès reproducteur observée en population naturelle.

Chapitre 4

Modélisation de l'évolution de la stérilité
femelle liée à l'incompatibilité

Chapitre 4. Modélisation de l'évolution de la stérilité femelle liée à l'incompatibilité

La modélisation qui fait l'objet de ce chapitre est présentée sous forme d'article en préparation pour *Heredity* : [Androdioecy revisited through incompatibility](#) (Christine Vassiliadis, Myriam Valero, Pierre Saumitou-Laprade and Bernard Godelle).

Je présente ici un résumé des principaux résultats de cet article.

Nous avons vu en introduction que les modèles de maintien de l'androdioécie classiques (Lloyd 1975 ; Charlesworth & Charlesworth 1978) prédisent que les mâles doivent avoir un avantage en fertilité (K) au moins double pour être maintenus par la sélection, et que leur fréquence d'équilibre est alors toujours inférieure à 50% : $(K-2)/2(K-1)$ (voir Encadré i.4, cas 1).

Dans cet article, nous développons un modèle dans lequel un système d'auto-incompatibilité lié génétiquement au déterminisme du sexe peut induire une sélection fréquence-dépendante sur la voie mâle et favoriser les allèles rares par la fonction mâle. Avec un tel système, un allèle de stérilité femelle peut donc être sélectionné et se répandre dans une population d'hermaphrodites. La dominance de l'allèle de stérilité femelle, le nombre d'allèles d'incompatibilité et l'avantage mâle en fertilité des individus mâles sont les trois paramètres de ce modèle que nous explorerons.

Le résultat principal est que, contrairement aux modèles classiques, ce modèle permet d'expliquer des fréquences de mâles supérieures à 50% dans une espèce fonctionnellement androdioïque, si l'allèle de stérilité femelle est dominant, et si le nombre d'allèles au locus d'incompatibilité est faible ; et ce même pour de faibles valeurs d'avantage mâle en fertilité.

Androdioecy revisited through incompatibility

Christine Vassiliadis¹, Myriam Valero^{1*}, Pierre Saumitou-Laprade¹ and Bernard Godelle^{2a}

¹Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales, UPRESA 8016, Bât SN2,
5 Université de Lille 1, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

²Laboratoire d'Evolution et Systématique des Végétaux, Université Paris Sud, Orsay France.

^a present address: Laboratoire Génome, Populations, Interactions ; case 063,
F-34095 Montpellier cedex 05, France.

10

* Author for correspondence: Myriam Valero, Laboratoire de Génétique et Evolution des
Populations Végétales, UPRESA 8016, Bât SN2, Université de Lille 1, F-59655 Villeneuve
d'Ascq cedex, France. Phone: 33 320 33 63 97; Fax: 33 320 43 69 79; email: [valero@univ-
lille1.fr](mailto:valero@univ-
lille1.fr)

15

Keywords: androdioecy, evolution, reproduction, self-incompatibility, female-sterility

Running title: Androdioecy revisited through incompatibility

Summary

20 Lloyd's (1975) and Charlesworth & Charlesworth's (1978) ESS models for the maintenance
of androdioecy predict that male (female-sterile individuals) must have an advantage in
fertility (K) of at least two in order to invade a hermaphroditic population, and that their
equilibrium frequency ($x_{eq} = (K-2)/2(K-1)$) is always less than 0.5. In this paper, we develop a
model in which male fertility is frequency-dependent, a situation not investigated in the
25 previous models, to explore the conditions for which high frequency of males could be
maintained at equilibrium. We demonstrate that a gametophytic self-incompatibility (GSI)

locus linked to a nuclear sex determinism locus, by causing a frequency-dependent selection, can favour rare alleles through male function and thus may induce the spread of the female-sterility allele within a hermaphroditic population. Contrarily to the classical results, the
30 model can explain male frequencies greater than 50% in a functionally androdioecious species, depending on three key parameters: the dominance of female-sterility at the sex locus, the number of SI allele at the self-incompatibility locus, and the advantage in fertility of male phenotype.

Introduction

35 The two symmetrical sexual dimorphisms: gynodioecy (co-occurrence of female with
hermaphroditic plants) and androdioecy (co-occurrence of male with hermaphroditic plants)
are both encountered in Angiosperms. Gynodioecy is the second most common plant breeding
system after hermaphroditism (7% and 72% of the species respectively, see Delannay, 1978;
Richards, 1997), while androdioecy is remarkably rare (less than ten species, Yampolsky &
40 Yampolsky, 1922; Charlesworth, 1984; Anderson & Symon, 1989; Vassiliadis, 1999). Lloyd
(1975) and Charlesworth & Charlesworth (1978) have developed evolutionary stable strategy
(ESS) models to understand the maintenance of these two sexual dimorphisms towards
hermaphroditism. They have demonstrated that unisexual plants cannot invade a
hermaphroditic population unless they have an advantage in fitness (K). Specifically,
45 assuming nuclear inheritance of sex and a large panmictic population, Lloyd (1975) and
Charlesworth and Charlesworth (1978) have demonstrated that unisexual plants must be at
least twice as fit as hermaphrodites ($K \geq 2$) and that their equilibrium frequency (x) is always
less than 0.5:

$$(1) \quad x = \frac{K - 2}{2(K - 1)}$$

50 Under these assumptions, as the same conditions hold for both male and female morphs, these
ESS models cannot explain why gynodioecy is more frequent than androdioecy.

Constraints are however different in gynodioecy compared with androdioecy. Females are
limited by the availability of resources to nurture their zygotes while males are limited by the
ability to successfully disperse their gametes (i.e. fertilise eggs) (Charnov, 1979). This issue
55 was addressed by including the effect of selfing in the above-mentioned models. In a partially
selfing hermaphroditic population, selective pressures for the spread of an unisexual mutant
are no longer identical for male and female plants (Lloyd, 1975; Charlesworth and

Charlesworth, 1978; Charlesworth, 1984). Female plants (always outcrossed) are favoured when selfed hermaphrodites suffer from inbreeding depression. On the other hand, the
60 occurrence of selfing lowers male plant fertility due to the reduction in the number of available female gametes. Consequently, gynodioecy may be maintained even if the female advantage in fitness is less than two. But for androdioecy to be maintained, the advantage of males must be more than double that of hermaphrodites, a condition difficult to be reached and that could explain the lower occurrence of androdioecy compared with gynodioecy.

65 Another possible explanation of the greater frequency of gynodioecy in nature is the nuclear-cytoplasmic inheritance of sex. In many of the wild gynodioecious species, expression of the sexual phenotype is the result of an interaction between nuclear and cytoplasmic genes (Couvét *et al.*, 1990), while in the only two well-studied androdioecious species, the mode of sex inheritance is nuclear (one dominant gene for male phenotype in *Mercurialis annua*
70 (Pannell, 1997a); two recessive genes in *Datisca glomerata* (Wolf *et al.*, 1997)). Various models using a nucleo-cytoplasmic inheritance of sex (Lewis, 1941; Couvét *et al.*, 1986; Frank, 1989) have demonstrated that conditions for the maintenance of gynodioecy are less restrictive compared with a simple nuclear genetic determinism. Moreover, these models established that female plants can reach equilibrium frequencies greater than 50%. Indeed,
75 high female frequencies are often observed in gynodioecious species (Cuguen *et al.*, 1994).

The existence of functional androdioecy (i.e. species in which male function of hermaphrodites has been proved to be effectively functional) has been verified only in a handful of plant species so far (*Datisca glomerata*, Liston *et al.*, 1990; Fritsch & Rieseberg, 1992; *Mercurialis annua*, Pannell, 1997b; Pannell, 1997c; *Fraxinus lanuginosa*, Ishida &
80 Hiura, 1998; *Schizopepon bryoniaefolius*, Akimoto *et al.*, 1999; *Phillyrea angustifolia*, Lepart & Dommée, 1992; Vassiliadis *et al.*, accepted, *Fraxinus ornus*, Dommée *et al.* 1999). The first two species are characterised by a male advantage more than double of that of

hermaphrodites; they exhibit essentially high outcrossing rates (but are not self-incompatible) and low male frequencies within populations (< 30%). These species thus present all the conditions necessary for the maintenance of male individuals according to Lloyd's (1975) and Charlesworth & Charlesworth's (1978) models. Contrarily to theoretical expectations, hermaphrodites of *S. bryoniaefolius* are highly endogamous. However, in this species, the rate of outcrossing was reported to vary with male frequency (Akimoto *et al.*, 1999) and male fertility is thus frequency-dependent, a condition that was not explored in the previous models. In *P. angustifolia*, high male frequencies are observed in populations (50% in most of the populations in Southern France, Lepart & Dommée, 1992; Vassiliadis, 1999) and male advantage is only approximately twice that of hermaphrodites (Vassiliadis *et al.*, accepted). In this species, hermaphrodites are self-incompatible and crossing success between hermaphrodites is more variable than between males and hermaphrodites, suggesting the occurrence of cross-incompatibility among hermaphrodites (Vassiliadis *et al.*, accepted).

In this paper, we explore how self-incompatibility may interact with sex determination in an androdioecious species to favour the fitness of male plants and thus their equilibrium frequency. A model is developed in which a locus of sex determination is linked genetically to a locus of self-incompatibility. The influence of three key-parameters are discussed: the dominance *versus* recessiveness of female-sterility allele, the male advantage in fitness (K) and the number of different self-incompatibility alleles (n).

Model's assumptions and parameters

The model developed in this study considers one infinite population, panmictic, with no pollen limitation, no overlapping generations, no migration or mutation. The initial population
105 contains only hermaphroditic individuals (initial frequency of males $x = 0$). The model considers a gametophytic self-incompatibility (GSI) system which involves one S locus, with n possible alleles: S_1, S_2, \dots, S_n . Under such a system, a given S_i pollen is compatible with any recipient sporophyte S_j/S_k (with j and $k \neq i$, and $j \neq k$). Initially, in the population, there are $n(n-1)/2$ different diploid genotypes which are all heterozygotes due to the incompatibility
110 system (Wright, 1939). At equilibrium, all these genotypes are at equal frequencies, because of the negative frequency-dependent selection caused by self-incompatibility. Consequently, each S_i allele is present at a frequency of $1/n$ in the population (Wright, 1939).

Starting from this equilibrium situation for self-incompatibility alleles, a second nuclear locus, noted A, governing the sexual phenotype is introduced. Two alleles are possible at this locus.
115 The allelic form A_m encodes for female-sterility (male phenotype) and A_f encodes for female-fertility (hermaphroditic phenotype). The two loci, S (self-incompatibility) and A (female-sterility), are under a complete linkage disequilibrium.

We examined two situations according to the dominance relationship between female-sterility and female-fertility: either female-sterility is dominant over female-fertility ($A_m > A_f$) or
120 recessive ($A_m < A_f$). In the first case, female-sterile individuals are heterozygotes and the female-sterility allele A_m is associated with only one self-incompatibility allele, S_1 . In the second case, because the female-sterility allele is recessive, males can only be homozygous for this allele, which would never occur if only one self-incompatibility allele is associated with the sterility allele. We thus supposed that two incompatibility alleles (S_1 and S_2) are in
125 complete linkage disequilibrium with the sterility allele (A_m). All other self-incompatibility alleles ($S_2 \dots S_n$ when female-sterility is dominant, $S_3 \dots S_n$ when female-sterility is recessive)

play the same role in the population for obvious symmetry reasons, and we will thus consider their frequencies identical.

Under the model's assumptions, in a population containing n incompatibility alleles, if female-sterility is dominant ($A_m > A_h$), one 'regular' pollen grain (not associated with female-sterility) will be incompatible if its incompatibility allele corresponds to one of the two alleles of the hermaphrodite recipient, which are different from each other and both different from S_1 (probability = $2/(n-1)$ since all non-male genotypes are present at the same frequency). All other 'regular' pollen grains are thus compatible with a probability of $1-(2/(n-1))$ or $(n-3)/(n-1)$ (see Table 1). If female-sterility is recessive ($A_m < A_h$), one 'regular' pollen grain (neither S_1 nor S_2) will be incompatible if its incompatibility allele corresponds to one of the two alleles of the recipient which are different each other and both different from S_1 and S_2 (probability = $2/(n-2)$). All other pollens are compatible with a probability of $1-(2/(n-2))$ or $(n-4)/(n-2)$ (see Table 2). In addition, when female-sterility is recessive, we have also to consider cases when a 'regular' pollen grain arrives on the stigma of a hermaphrodite bearing one S -allele associated with the female-sterility allele (i.e. S_1 or S_2), the other being any other S -allele. The compatibility probability in that case is $(n-3)/(n-2)$ (see Table 2). In the model presented in this paper, we defined the male advantage (K) as the amount of pollen produced by a male divided by the amount of pollen produced by a hermaphrodite. Moreover, we suppose that no fitness variation occurs within each sexual phenotype.

Dominant model ($A_m > A_h$)

All the different possible genotypes and their associated phenotypes found under the assumption of dominant female-sterility are presented in Table 1A, along with their relative male-fertilities and frequencies.

The crossing table (Table 1B) among pollen donors and hermaphrodites recipients observed at generation t , gives the compatibility conditions for each cross, the frequency of compatible

pollen genotypes and the genotypes produced in the next generation (t+1). Not all the pollen types contribute the next generation. Therefore, the frequency of a progeny genotype must be weighted by the frequency of compatible pollen over each hermaphrodite recipient. This
 155 allows the calculation of the male frequency in the generation t+1 (x'), given in the following recursion equation:

$$(2) x' = \frac{\frac{Kx}{2}}{\frac{Kx}{2} + \left(\frac{n-3}{n-1}\right)\left(\frac{Kx}{2} + 1-x\right)} = \frac{\frac{Kx}{2}}{Kx \frac{n-2}{n-1} + (1-x)\frac{n-3}{n-1}}$$

Recessive model (Am < Ah)

160 The different genotypes of the individuals under this assumption, their associated phenotypes, relative male fertility, and frequencies are presented in Table 2A.

The frequency of compatibility of a pollen genotype with a hermaphrodite recipient S_jA_n/S_kA_n ($j \neq k$, j and $k \neq 1$), and the phenotype of the progeny produced are presented in Table 2B.

This allows the calculation of the male frequency at generation t+1 (x'), according to the four
 165 following recursion equations:

$$(3) x' = \frac{y}{2y+z} \left[\frac{Kx+y}{Kx+y+2\left(\frac{n-3}{n-2}\right)(y+z)} \right]$$

$$(4) y' = \frac{1}{2(2y+z)} \left[y + \frac{z(Kx+y)}{Kx+y+\left(\frac{n-4}{n-2}\right)(y+z)} \right]$$

$$(5) t' = y'$$

$$(6) z' = \frac{y+z}{2y+z} \left[\frac{2y\left(\frac{n-3}{n-2}\right)}{Kx+y+\left(\frac{n-3}{n-2}\right)(y+z)} + \frac{z\left(\frac{n-4}{n-2}\right)}{Kx+y+\left(\frac{n-4}{n-2}\right)(y+z)} \right]$$

170

Results

Dominant model

The equilibrium male frequencies (x_{eq}) were easily found by solving the recursion equation (2), for $x' = x$. The solution of the resulting first-degree equation is given in the following
175 equation:

$$(7) \quad x_{eq} = \frac{K \left(\frac{n-1}{n-3} \right) - 2}{2 \left[K \left(\frac{n-2}{n-3} \right) - 1 \right]}$$

This result looks very similar to the equilibrium frequency obtained by Lloyd (1975) and

Charlesworth and Charlesworth (1978) given in equation (1) : $x = \frac{K-2}{2(K-1)}$, when replacing

K in the denominator by $K' = K \left(\frac{n-2}{n-3} \right) > K$ and in the numerator by $K \left(\frac{n-1}{n-3} \right)$. Replacing

180 K by K' makes sense since the ratio $\frac{n-2}{n-3} > 1$ corresponds to the cross-compatibility

advantage of males compared with hermaphrodites, as we shall demonstrate in the following paragraph.

The genotype of a male is $S_i A_m / S_i A_h$ ($i \neq 1$), and thus it produces half $S_i A_m$ and half $S_i A_h$ pollen. The genotype of a hermaphrodite is $S_j A_h / S_k A_h$ (with $j \neq k$, j and $k \neq 1$; for instance

185 $S_2 A_h / S_3 A_h$).

On a given stigma, S_1 pollen grains are always able to grow, whereas S_i pollen grains have a

probability $\frac{n-3}{n-1}$ to be able to germinate.

Indeed, out of the $n-1$ possible alleles ($i = 2 \dots n$), $n-3$ alleles are compatible ($i = 4 \dots n$ in our example). The mean probability for a pollen grain produced by a male to be able to germinate

190 on a stigma is thus $\frac{1}{2} + \frac{n-3}{2(n-1)} = \frac{n-2}{n-1}$.

On the same stigma (say S_2A_h/S_3A_h), the mean probability for a pollen grain produced by a

hermaphrodite to be able to germinate is $\frac{n-3}{n-1}$.

The ratio $\frac{\frac{n-2}{n-1}}{\frac{n-3}{n-1}} = \frac{n-2}{n-3} > 1$ is thus the cross-compatibility advantage of males relative to

hermaphrodites. Such a difference between males and hermaphrodites does not exist when S_1

195 alleles can be either associated with A_h allele or with A_m allele: in this case, the equilibrium

male frequency is the classical one, corresponding to equation (1). When allele S_1 and allele

A_m are in complete linkage disequilibrium, cross-compatibility advantage cannot alone

account for the whole modification of the male equilibrium frequency. Indeed, taking into

account cross-compatibility advantage would lead to a male frequency of x_{theor} given by the

200 following equation:

$$x_{theor} = \frac{\mathbf{K\left(\frac{n-2}{n-3}\right) - 2}}{2\left[\mathbf{K\left(\frac{n-2}{n-3}\right) - 1}\right]} < \frac{\mathbf{K\left(\frac{n-1}{n-3}\right) - 2}}{2\left[\mathbf{K\left(\frac{n-2}{n-3}\right) - 1}\right]} = x_{eq}.$$

The difference affecting the numerator (in bold characters) can be explained by comparing the

recursion equation for x obtained in our model (equation (2), rewritten using $K' = K\left(\frac{n-2}{n-3}\right)$)

$$(8) \quad x' = \frac{1}{2} \frac{n-1}{n-2} \frac{K'x}{K'x + (1-x)},$$

205 with the recursion equation corresponding to the classical phenotypic model:

$$(9) \quad x' = \frac{1}{2} \frac{K'x}{K'x + (1-x)}.$$

Equation (9) gives the expected proportion of males x' at the generation $t+1$, when males represent a fraction x of the population at generation t , and produce K' more male gametes than hermaphrodites.

210 The factor $\frac{1}{2}$ stands for the fact that half of male offspring are males. In our model, this is no longer true. Males indeed produce one half of S_1A_m gametes, and one half of S_1A_h gametes.

But on a given stigma, the germination probability of S_1A_h pollen grains is only $\frac{n-3}{n-1}$. The

mean proportion of a male offspring bearing allele S_1A_m is thus $\frac{\frac{1}{2}}{\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \frac{n-3}{n-1}} = \frac{1}{2} \frac{n-1}{n-2} > \frac{1}{2}$

instead of $1/2$.

215 The combined effects of the cross-compatibility advantage ($K' = K \left(\frac{n-2}{n-3} \right) > K$) and of the

biased sex-ratio in male offspring ($\frac{1}{2} \frac{n-1}{n-2} > \frac{1}{2}$) can lead to very high male frequencies. For

$n = 3$, male frequency reach unity, leading to population extinction (Fig. 1). For higher values of n , male frequency is always higher than the classical value $(K-2)/2(K-1)$ predicted by the resource allocation theory with a simple nuclear determinism (Fig. 1), although it approaches

220 this limit for large n . Note that for low values of male advantage, K (between 1 and 2, not

shown), males cannot be maintained in the classical resource allocation models. In contrast, they can be maintained at rather high frequencies under our model. For instance, with $K = 1.5$ and with six self-incompatibility alleles, 25 % males can be maintained at equilibrium in our model (following equation (2)). Only with a much higher male advantage ($K = 3$) could such a

225 proportion of males be reached under the classical model (equation (1)). In our model, the frequency of male is higher than 0.5 when $K > n-3$ (from equation (7)).

Furthermore hermaphrodites are not simply cryptic females, since their pollen grains can fertilise the ovules of other hermaphrodites. For instance, when $K = 2$ and $n = 5$, there are

230 $5 \times (5-1) / 2 = 10$ possible plant genotypes, all of which are heterozygous at the self-

incompatibility locus (Table 3). Among these ten genotypes, four bear the dominant female-sterility allele and one of the other alleles (see Table 3). Considering a given hermaphroditic plant (say an S_2S_3 plant, see Table 4), the proportion of S_1A_m pollen grains which germinate on the stigma is 0.5, which ensures that half of the progeny are males. Of the remaining half of efficient pollen grains (non- S_1A_m), one half has been produced by males, and one half by five different types of hermaphrodites, which are thus not cryptic females, but true hermaphrodites. In a classical model and in a population made of 50 % of males (since half of male offspring are males), there cannot be any real hermaphrodites. In our model, it is however possible to observe one half of males in the population with a real male function attributable to hermaphrodites, which is possible only because of the biased sex-ratio in male progeny (previously shown).

Recessive model

When assuming a recessive determinism for female-sterility, it is not possible to solve analytically the recursion equations for $x' = x$ to find the equilibrium frequency of males. We thus iterated the recursion equations numerically for various parameter sets (equations (3), (4), (5), and (6)) using the *Mathematica* software version 3.0 (Wolfram, 1996). Because the female-sterility allele is recessive, males can only be homozygous for this allele, so that the only possible genotype for males will be S_1A_m/S_2A_m (Table 2A).

With such a recessive determinism of female-sterility, equilibrium male frequency is in general smaller than in the classical resource allocation model, except for small K and small n (Fig. 2).

Discussion

Our model demonstrates that an incompatibility system in complete linkage to a sex determinism, by causing a frequency-dependent selection, can favour rare alleles through male function and thus may induce the spread of the female-sterility allele within a hermaphroditic population. Contrarily to the classical results predicted by the resource allocation theory (Lloyd, 1975; Charlesworth & Charlesworth, 1978), the model can explain male frequencies greater than 0.5 in a functionally androdioecious species. However, the equilibrium frequency of male phenotypes was highly dependent on three key parameters: the dominance of female-sterility at the sex locus, the number of SI allele at the self-incompatibility locus, and the fitness advantage of the male morph.

We chose to model a GSI rather than a sporophytic self-incompatibility for several reasons. First, GSI is more widespread than SSI in Angiosperms families; second, GSI is simpler to implement and thus ideal for a first approach; finally, GSI is the only system in which maleness can be associated with a single S-allele. In the SSI case, the female-sterile haplotype would never benefit from an absolute cross-compatibility advantage.

In our study, both cases of dominance do not account for the same results. If female-sterility is dominant, high frequency of males ($> 50\%$) can be maintained within populations even when their advantage in fitness is low ($K \leq 2$), as long as the number of SI alleles is also low ($n < 6$) (Fig. 1). On the other hand, if female-sterility is recessive, equilibrium male frequency is smaller than or equal to 0.5 (Fig. 2). When the determinism of female-sterility is dominant, only one SI allele is associated with female-sterility (S_1A_m) and it is exclusively paternally inherited. This haplotype is more frequently transmitted than others because it benefits from (1) a cross-compatibility advantage $\frac{n-2}{n-3} > 1$ due to the allele S_1 : males were always compatible (full or half-compatible) with all hermaphroditic genotypes; (2) a male-biased

paternal sex-ratio $\frac{1}{2} \frac{n-1}{n-2} > \frac{1}{2}$ due to a better cross-compatibility of male-determining alleles;

and (3) a male fitness advantage (K). The first two phenomena are due to the fact that males can interact with n-1 partners (different genotypes) and cannot receive pollen, whereas hermaphrodites have only n-2 possible partners and receive pollen from other hermaphrodites.

280 This increases the inbreeding within the hermaphrodite sub-population. However, as the number of SI alleles (n) increases, incompatibility among hermaphrodites decreases and the male cross-compatibility advantage becomes negligible. Consequently, when n is high, the difference in fitness between males and hermaphrodites depends only on their relative advantage in male fitness, and the frequency of male at equilibrium reaches the classical
285 results of allocation theory.

If female-sterility is recessive, by construction, it is necessary to consider that two different SI alleles (S_1 and S_2) are associated with the female-sterility allele (A_m). However, because female-sterility is recessive, the two male haplotypes (S_1A_m and S_2A_m) can be found in a heterozygous state in hermaphroditic individuals so that no haplotype is exclusively
290 associated with male and paternally inherited. Consequently, in the recessive case, males benefit only from a weak cross-compatibility advantage. Moreover, paradoxically, we have found that the male advantage in fitness (K) favours the frequency of hermaphrodites: as K increases, the frequency of S_1A_m and S_2A_m haplotypes increases in the pollen pool, and providing that n is large enough, more hermaphrodites phenotypes (heterozygotes for S_1A_m or
295 S_2A_m haplotypes) will be produced than male phenotypes. Consequently, when male-sterility is recessive, the equilibrium male frequency is even smaller than in the classical resource allocation model for large values of n and K (Fig. 2). The genetics of sex determinism has been studied in only two species; female-sterility is dominant in one species (Pannell, 1997a)

and recessive in the other (Wolf *et al.*, 1997). Therefore, it is not possible to conclude on the
300 dominance of female-sterility.

We chose a gametophytic incompatibility system in which males have always a cross-compatibility advantage; in the case of a sporophytic incompatibility system (not shown here), maleness cannot be associated with only one S-allele, thus this model cannot account for high frequencies of male at equilibrium.

305 In a gametophytic self-incompatibility system, theoretical works have demonstrated that the number of SI alleles that are maintained at mutation-selection equilibrium within a finite population depends on the population size (Wright, 1939; Vekemans and Slatkin, 1994; Vekemans *et al.*, 1998; Schierup, 1998) and may be less than 6 when $N < 50$ (Vekemans and Slatkin, 1994; Schierup, 1998). This small value of n , which is the upper limit necessary to
310 maintain high frequency of males in our dominant model, is thus plausible in small populations.

The linkage between the two loci is a key assumption in our model. Indeed, if the linkage between self-incompatibility and sex determinism is not complete, our results would again coincide with those of the classical resource allocation model (results not shown). However, if
315 population size and n are small enough, the recombinant haplotype for SI allele originally associated with female-sterility (for example S_1A_h in the dominant model) will have a higher probability of being lost by drift than the non-recombinant male haplotypes (S_1A_m).

The linkage disequilibrium can however be explained if we consider, in the dominant model, the 'male' haplotype as a selfish gene: it is exclusively paternally inherited and favours its
320 own transmission by suppressing the female function. (In the recessive model, there would be two such selfish haplotypes). The recombination between the two loci would be selected-against. Such selfish haplotypes implying two loci (poison/antidote) that never recombine

(placed in inversion for example) have been described, as sex-ratio distorters (see review in Werren & Beukeboom, 1998).

325 In conclusion, a gametophytic self-incompatibility (GSI) system linked to a nuclear sex
determinism, by causing a frequency-dependent selection, may explain high frequencies of
males reported in some androdioecious species (in the functional androdioecious species *P.*
angustifolia (Vassiliadis, 1999) and in the two other species *Fraxinus lanuginosa* (Ishida &
Hiura, 1998) and *Fraxinus ornus* (Dommée et al. 1999) for which the pollen of
330 hermaphrodites has been proved to be potentially fertile). The conditions required by the
model to explain the maintenance of high male frequency within a hermaphroditic population:
dominance of female-sterility ($A_m > A_h$) and complete linkage between A_m and S_1 alleles, may
be rarely encountered in nature. Indeed, androdioecious systems are remarkably rare.

References

- 335 AKIMOTO, J., FUKUHARA, T. AND KIKUZAWA, K. 1999. Sex ratios and genetic variation in a functionally androdioecious species, *Schizopepon bryoniaefolius* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany*, **86**, 880-886.
- ANDERSON, G. J. AND SYMON, D. E. 1989. Functional dioecy and andromonoecy in *Solanum*. *Evolution*, **43**, 204-219.
- 340 ARONNE, G. AND WILCOCK, C. C. 1994. Reproductive characteristics and breeding system of shrubs of the Mediterranean region. *Functional Ecology*, **8**, 69-76.
- CHARLESWORTH, B. AND CHARLESWORTH, D. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist*, **112**, 975-997.
- CHARLESWORTH, D. 1984. Androdioecy and the evolution of dioecy. *Biological Journal of*
345 *the Linnean Society*, **23**, 333-348.
- CHARNOV, E. L. 1979. Simultaneous hermaphroditism and sexual selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **76**, 2480-2484.
- COUVET, D., ATLAN, A., BELHASSEN, E., GLIDDON, C. J., GOUYON, P. H. AND KJELLBERG, F. 1990. Coevolution between two symbionts: the case of cytoplasmic male sterility in
350 higher plants. *Oxford Survey in Evolutionary Biology*, **7**, 225-249.
- COUVET, D., BONNEMAISON, F. AND GOUYON, P. H. 1986. The maintenance of females among hermaphrodites: the importance of nuclear-cytoplasmic interactions. *Heredity*, **57**, 325-330.
- CUGUEN, J., WATTIER, R., SAUMITOU-LAPRADE, P., FORCIOLI, D., MÖRCHEN, M., VAN DIJK, H. AND VERNET, P. 1994. Gynodioecy and mtDNA polymorphism in natural
355 populations of the gynodioecious species *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *Genetics Selection Evolution*, **26**, 87-101.

- DELANNAY, X. 1978. La gynodioecie chez les angiospermes. *Naturalistes Belges*, **59**, 223-235.
- 360 DOMMÉE, B., GESLOT, A., THOMPSON, J.D., REILLE, M., AND DENELLE, N. 1999. Androdioecy in the entomophilous tree *Fraxinus ornus* (Oleaceae). *New Phytologist* **143**, 419-426.
- FRANK, S. A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *American Naturalist*, **133**, 345-376.
- 365 FRITSCH, P. AND RIESEBERG, L. H. 1992. High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature*, **359**, 633-636.
- ISHIDA, K. AND HIURA, T. 1998. Pollen fertility and flowering phenology in an androdioecious tree, *Fraxinus lanuginosa* (Oleaceae), in Hokkaido, Japan. *International*
- 370 *Journal of Plant Sciences*, **159**, 941-947.
- LEPART, J. AND DOMMÉE, B. 1992. Is *Phillyrea angustifolia* L. (Oleaceae) an androdioecious species? *Botanical Journal of the Linnean Society*, **108**, 375-387.
- LEWIS, D. 1941. Male-sterility in natural populations of hermaphrodite plants. *New Phytologist*, **40**, 56-63.
- 375 LISTON, A., RIESEBERG, L. H. AND ELIAS, T. S. 1990. Functional androdioecy in the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature*, **343**, 641-642.
- LLOYD, D. G. 1975. The maintenance of gynodioecy and androdioecy in angiosperms. *Genetica*, **45**, 325-339.
- PANNELL, J. 1997a. Mixed genetic and environmental sex determination in an
- 380 androdioecious population of *Mercurialis annua*. *Heredity*, **78**, 50-56.
- PANNELL, J. 1997b. Variation in sex ratios and sex allocation in androdioecious *Mercurialis annua*. *Journal of Ecology*, **85**, 57-69.

- PANNELL, J. 1997c. Widespread functional androdioecy in *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae). *Biological Journal of the Linnaean Society*, **61**, 95-116.
- 385 RICHARDS, A. J. 1997. *Plant breeding systems*, Chapman & Hall, London, UK.
- SCHIERUP, M. H. 1998. The number of self-incompatibility alleles in a finite, subdivided population. *Genetics*, **149**, 1153-1162.
- VASSILIADIS, C. 1999. Evolution et maintien de l'androdioécie. Etude théorique et approches expérimentales chez *Phillyrea angustifolia* L. PhD thesis. Université des Sciences et technologies de Lille, Lille.
- 390 VASSILIADIS, C., LEPART, J., SAUMITOU-LAPRADE, P. AND VERNET, P. Self-incompatibility and male fertilisation success in *Phillyrea angustifolia* (Oleaceae). Accepted in *International Journal of Plant Sciences*.
- VEKEMANS, X., SLATKIN, M. 1994. Gene and allelic genealogies at a gametophytic self-incompatibility locus. *Genetics*, **137**, 1157-1165.
- 395 VEKEMANS, X., SCHIERUP, M. H. AND CHRISTIANSEN, F. B. 1998. Mate availability and fecundity selection in multi-allelic self-incompatibility systems in plants. *Evolution*, **52**, 19-29.
- WERREN, J.H. AND BEUKEBOOM, L.W. 1998. Sex determination, sex ratios, and genetic conflict. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **29**, 233-261.
- 400 WOLF, D. E., RIESEBERG, L. H. AND SPENCER, S. C. 1997. The genetic mechanism of sex determination in the androdioecious flowering plant, *Datisca glomerata* (Datisceae). *Heredity*, **78**, 190-204.
- WOLFRAM, S. 1996. *The Mathematica book*, Wolfram Media, Cambridge University Press, Cambridge.
- 405 WRIGHT, S. 1939. The distribution of self-sterility alleles in populations. *Genetics*, **24**, 538-552.

YAMPOLSKY, C. AND YAMPOLSKY, H. 1922. Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. *Bibliotheca Genetica*, 3, 1-62.

410 Table 1: Characteristics of crosses and progeny in the dominant model
 ($A_m > A_h$): only one 'male' haplotype is found ($S_i A_m$) in the
 population which contains n incompatibility alleles.

A. Genotypes and associated phenotypes, relative male fertility and
 frequencies of individuals (there must be at least 3 self-incompatibility
 415 alleles).

Genotype	Sexual phenotype	Relative male fertility	Fq
$\frac{S_i A_m}{S_i A_h}$ $i \neq 1$	Male	K	x
$\frac{S_i A_h}{S_j A_h}$ $i \neq 1, j \neq 1, i \neq j$	Hermaphrodite	1	1-x

B. Crossing table among pollen donors and hermaphrodite recipients

Recipient genotype (frequency)	Pollen genotype (frequency)	
S_iA_i/S_jA_h (1)	S_1A_m $(Kx/2)^*$	S_kA_h $(Kx/2^* + (1-x)**)$
Compatibility conditions	Always compatible	$k \neq i$ and $k \neq j$
Compatibility probability	1	$(n-3)/(n-1)$
Progeny genotype	S_1A_m/S_iA_h $i \neq 1$	S_iA_i/S_kA_h $i \neq 1, k \neq 1, i \neq k$
Progeny frequency	$(Kx/2)/W$	$((Kx/2 + (1-x)) (n-3)/(n-1))/W$

* pollen produced by male; ** pollen produced by hermaphrodite; W: weighting factor due to the fact that all pollen types do not contribute to the next generation.

Table 2: Characteristics of crosses and progeny in the recessive model ($A_h > A_m$): two 'male' haplotypes are found (S_1A_m and S_2A_m) in the population which contains n incompatibility alleles.

A. Genotypes and associated phenotypes, relative male fertility and frequencies of individuals (there must be at least 3 self-incompatibility alleles).

Genotype	Sexual phenotype	Relative male fertility	Fq $x+y+z+t = 1$
$\frac{S_1 A_m}{S_2 A_m}$	Male	K	x
$\frac{S_1 A_m}{S_i A_h}$ $i \neq 1 \text{ and } 2$	Hermaphrodite	1	y
$\frac{S_2 A_m}{S_i A_h}$ $i \neq 1 \text{ and } 2$	Hermaphrodite	1	t^*
$\frac{S_i A_h}{S_j A_h}$ $i \text{ and } j \neq 1 \text{ and } 2, i \neq j$	Hermaphrodite	1	z

* For obvious symmetrical reasons, $t = y$

B. Crossing table among pollen donors and hermaphrodite recipients

Recipient genotype (frequency)	Pollen genotype (frequency)		
S_jA_h/S_kA_h $z/(y+t+z) = z/(2y+z)$	S_1A_m $Kx/2^* + y/2^{**}$	S_2A_m $Kx/2^* + t/2^{**}$	S_iA_h $y/2 + t/2 + z^{**}$
Compatibility conditions	Always compatible	Always compatible	$i \neq j$ and $i \neq k$
Compatibility probability	1	1	$(n-4)/(n-2)$
Progeny genotype	S_1A_m/S_iA_h $i \neq 1$	S_2A_m/S_iA_h $i \neq 2$	S_iA_h/S_jA_h and S_iA_h/S_kA_h $i \neq j$ and $k, j \neq k$, i, j and $k \neq 1$ and 2
Progeny frequency	$(Kx + y)/2W$	$(Kx + t)/2W$	$[(z + (y+t)/2) (n-4)/(n-2)]/W$
S_1A_m/S_jA_h $y/(2y+z)$			
Compatibility conditions	Incompatible	Always compatible	$i \neq 1$ and $i \neq j$

Compatibility probability		1	$(n-3)/(n-2)$
Progeny genotype		S_2A_m/S_jA_h $j \neq 1 \text{ and } 2$	S_1A_m/S_2A_m S_1A_m/S_iA_h $i \neq 1 \text{ and } 2$ S_iA_h/S_jA_h $i \neq j$
Progeny frequency		$(Kx + t)/2W$	$[(z + (y+t)/2) (n-3)/(n-2)]/W$

S_2A_m/S_jA_h
 $t/(2y+z)$

Compatibility conditions	Always compatible		$i \neq j \text{ and } i \neq 2$
Compatibility probability	1		$(n-3)/(n-2)$
Progeny genotype	S_2A_m/S_iA_h $i \neq 1 \text{ and } 2$	S_1A_m/S_2A_m	S_1A_m/S_iA_h $i \neq 1 \text{ and } 2$ S_iA_h/S_jA_h $i \neq j, i \text{ and } j \neq 1 \text{ and } 2$
Progeny frequency	$(Kx+y)/2W$		$[(z+(y+t)/2) (n-4)/(n-2)]/W$

* pollen produced by male; ** pollen produced by hermaphrodite;. W: weighting factor due to the fact that all pollen types are not compatible; in gray: incompatible crosses

Table 3: Amount of pollen grains produced in a population at equilibrium with a two-fold relative fertility advantage for males and five self-incompatibility alleles, the fifth allele (denoted S_1A_m) causing dominant female-sterility. In this case, the equilibrium frequency of males is 0.5. Half of the S_2 pollen grains are produced by hermaphrodites ($3 \times 1/24$), half are produced by males ($1/8$). All S_1A_m pollen grains are produced by males.

	Hermaphrodites: total frequency = 0.5						Males: total frequency = 0.5				
Genotype	S_2A_h/S_3A_h	S_2A_h/S_4A_h	S_2A_h/S_5A_h	S_3A_h/S_4A_h	S_3A_h/S_5A_h	S_4A_h/S_5A_h	S_1A_m/S_2A_h	S_1A_m/S_3A_h	S_1A_m/S_4A_h	S_1A_m/S_5A_h	
Frequency	1/12	1/12	1/12	1/12	1/12	1/12	1/8	1/8	1/8	1/8	
Male fertility	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	
Amount of pollen grains produced	$S_2A_h: 1/24$	$S_2A_h: 1/24$	$S_2A_h: 1/24$				$S_2A_h: 1/8$				
	$S_3A_h: 1/24$			$S_3A_h: 1/24$	$S_3A_h: 1/24$			$S_3A_h: 1/8$			
		$S_4A_h: 1/24$		$S_4A_h: 1/24$		$S_4A_h: 1/24$		$S_4A_h: 1/8$			
			$S_5A_h: 1/24$		$S_5A_h: 1/24$	$S_5A_h: 1/24$				$S_5A_h: 1/8$	
						$S_1A_m: 1/8$	$S_1A_m: 1/8$	$S_1A_m: 1/8$	$S_1A_m: 1/8$		

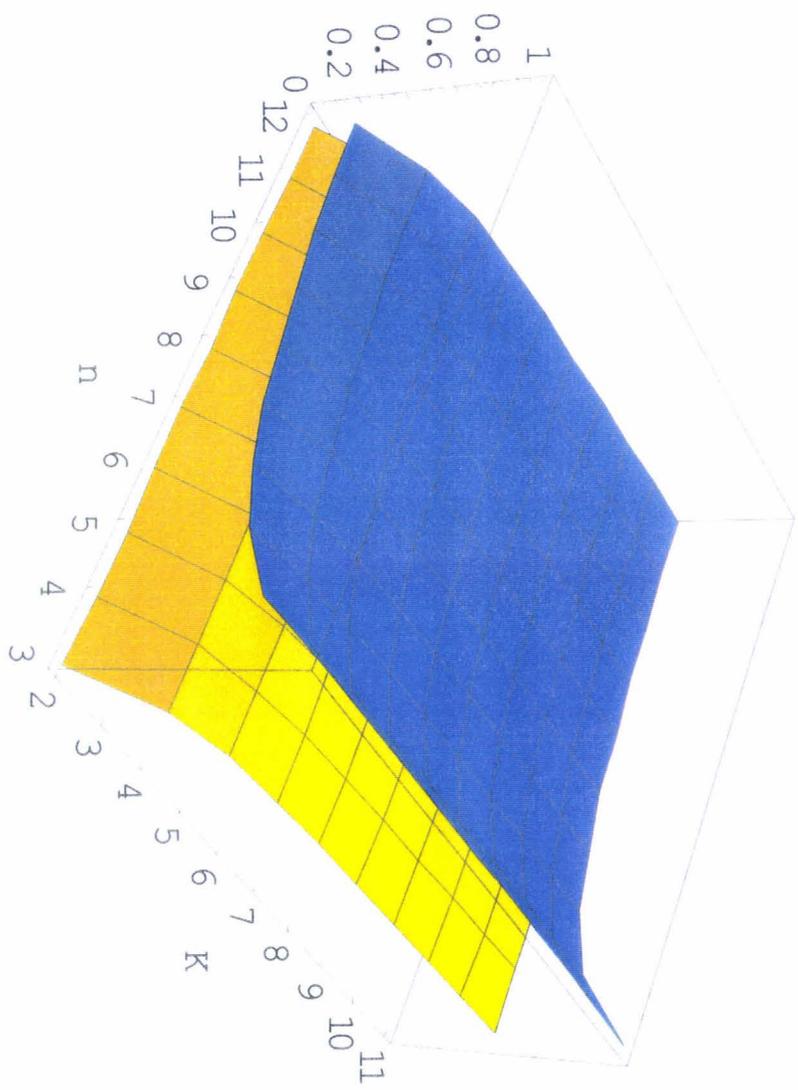
Table 4: What happens in an S_2A_h/S_3A_h flower. Only S_4A_h , S_5A_h and S_1A_m pollen grains germinate. Half of the ovules are fertilised by S_1A_m pollen grains, produced only by males. Half of the ovules are fertilised by S_4 or S_5 pollen grains, half of which being produced by males, and the remaining half by hermaphrodites, which are thus not cryptic females (even though the male proportion in the population is 0.5). Males thus contribute for all S_1A_m alleles and 1/2 of non- S_1A_m alleles, whereas hermaphrodites contribute 1/2 of non- S_1A_m alleles.

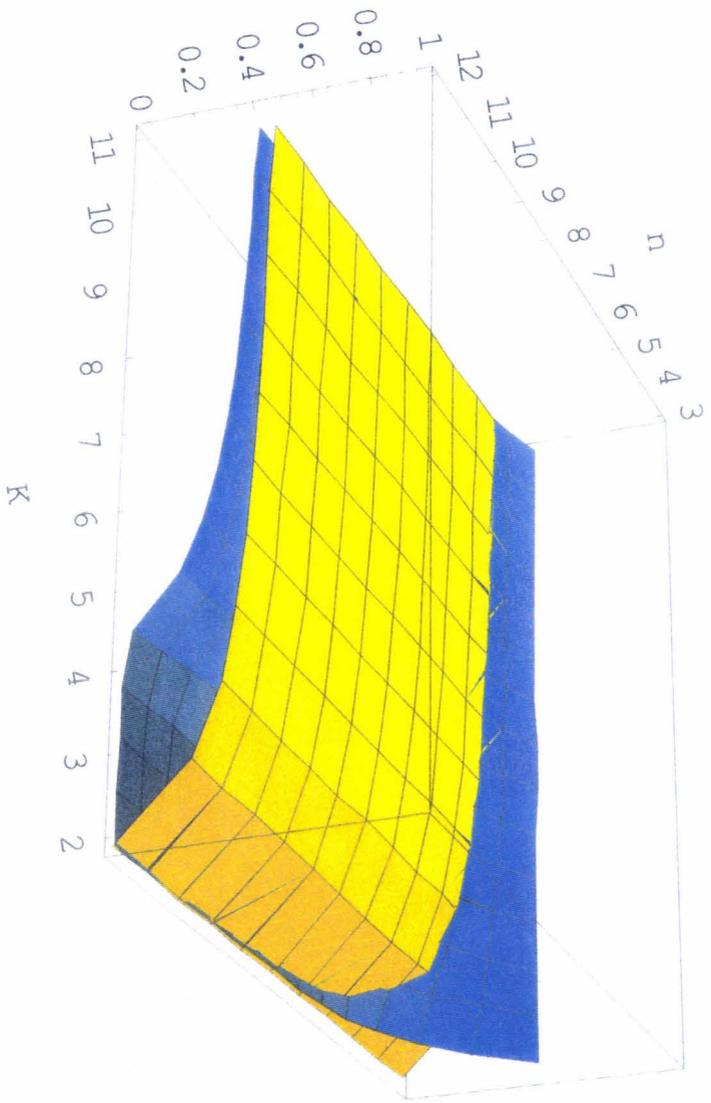
Pollen grains genotypes	S_2A_h	S_3A_h	S_4A_h	S_5A_h	S_1A_m
Available amount issued from:	1/4	1/4	1/4	1/4	1/2
Hermaphrodites	1/2	1/2	1/2	1/2	0
Males	1/2	1/2	1/2	1/2	1
Pollen grain fitness	0	0	1	1	1
Proportion of ovules sired	0	0	1/4	1/4	1/2
Pollen-donors contribution					
Hermaphrodites			1/8	1/8	0
Males			1/8	1/8	1/2

Captions to figures

Figure 1. Male frequency at equilibrium in our dominant model (upper nappe, equation (2)) and in the classical model (lower nappe, equation (1)), in function of the number of S-alleles (n , from 3 to 12) and the relative male advantage in fertility (K , from 2 to 11).

Figure 2. Male frequency at equilibrium in our recessive model (lower nappe, obtained at equilibrium with equations (3)-(6)) and in the classical model (upper nappe, equation (1)), in function of the number of S-alleles (n , from 3 to 12) and the relative male advantage in fertility (K , from 2 to 11).





Conclusions - perspectives

Conclusions et perspectives

Les deux études expérimentales menées sur le système de reproduction de *Phillyrea angustifolia*, d'une part par des pollinisations contrôlées avec simple donneur de pollen (Chapitre 2), et d'autre part par des analyses de paternité en population naturelle et donc en situation de compétition, à l'aide de marqueurs microsatellites mis au point chez cette espèce (Chapitre 3), convergent vers les résultats suivants :

- (1) *P. angustifolia* est bien fonctionnellement androdioïque. En effet, la fertilité mâle des hermaphrodites a bien été mise en évidence par les deux approches
- (2) l'estimation de l'avantage mâle en fécondité est faible ; des valeurs de l'ordre de 1,5 à 2 ont été obtenues dans les deux cas
- (3) l'auto-incompatibilité des hermaphrodites a également été montrée, au niveau pré-zygotique notamment

Le plus faible succès reproducteur mâle des hermaphrodites peut s'expliquer par une réallocation des ressources vers la voie femelle, étape intermédiaire et transitoire de l'évolution vers la dioécie.

De plus, nous avons observé (dans les deux expériences) une forte variance du succès reproducteur mâle des hermaphrodites, certains hermaphrodites ne produisant quasiment aucun descendant par la voie mâle, et pouvant être considérés comme mâle-stériles, alors que d'autres apparaissent comme de très bons donneurs.

Dans l'expérience de la mesure de l'avantage mâle par analyse de paternité (Chapitre 3), cette forte variance pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs : une synchronisation des phénologies des individus donneurs et receveurs, que nous n'avons pas mesurée ; un effet distance ; et peut-être un effet de compatibilité entre donneurs et receveurs.

Les résultats des croisements contrôlés (Chapitre 2), dans lesquels ni la phénologie ni la distance n'interviennent, montrent par ailleurs quelques croisements potentiellement incompatibles, et ce uniquement entre hermaphrodites.

Cette possibilité d'un avantage mâle en terme de compatibilité⁷ a été explorée sous forme d'un modèle (Chapitre 4), où le locus de stérilité femelle est lié au locus d'incompatibilité. Contrairement aux modèles classiques de maintien de l'androdioécie, ce modèle permet d'expliquer des fréquences de mâles supérieures à 50% chez une espèce fonctionnellement

⁷ déjà évoquée en introduction à propos des espèces animales androdioïques où seuls les mâles sont capables d'allofécondation (incompatibilité intra-phénotypique totale).

androdioïque, même si l'avantage mâle est faible, pourvu que la stérilité femelle soit dominante, et que le nombre d'allèles d'incompatibilité soit réduit.

A la lumière de ce modèle, le faible avantage mâle en fécondité estimé lors des expérimentations ne serait pas en contradiction avec les fortes proportions de mâles observées dans les populations naturelles de *P. angustifolia* dans le Sud de la France.

Ce travail a permis d'asseoir le statut androdioïque de *Phillyrea angustifolia*. Il devrait être suivi par des études plus approfondies, concernant:

1. Le système de reproduction

- Une investigation au niveau pré-zygotique par observation de croissance de tubes polliniques après croisements par du pollen de différentes origines devrait permettre de tester l'existence d'une réelle incompatibilité entre hermaphrodites.
- Le succès reproducteur mâle des individus mesuré par analyse de paternité nécessite certains compléments d'analyses (le génotypage de tous les individus potentiellement parents et des 3 descendances manquantes ; l'étude d'un troisième locus qui permettrait d'utiliser une méthode d'assignation directe) et mériterait d'être étudié sur des populations situées dans des contextes écologiques différents comme des populations continues de grande taille.
- Le développement du modèle en population structurée avec effets des paramètres de migration et de dérive, et l'étude de l'effet du taux de recombinaison sur les conditions de maintien de l'androdioécie et de la fréquence de mâles à l'équilibre. En effet, c'est en petites populations isolées avec effets de fondation et de dérive que l'on pourrait trouver un faible nombre d'allèles d'incompatibilité.

2. La survie

La compréhension du système de reproduction androdioïque (chez cette espèce) passe par l'intégration de différents paramètres : fertilité, mais aussi survie.

La longévité des espèces pérennes, arbres et arbustes en particulier est l'un des paramètres clefs de leur valeur sélective (Encadré i.2). La prise en compte de ce paramètre permettrait d'expliquer de fortes fréquences de mâles en populations (voir Encadré i.4 cas n°3 : avec un avantage en fertilité de K_f , il faut un avantage en survie de $K_s > (K_f+2)/K_f$ pour maintenir plus de 50% de mâles ; par ex. avec $K_f = 2$, il faut $K_s > 2$).

Un tel avantage en survie a été suggéré par des observations (Strasberg, 1988). Des études démographiques sont nécessaires afin d'estimer la valeur sélective sur la durée de vie totale des deux phénotypes sexuels (mâle et hermaphrodite). Ce type d'étude a été menée chez

Silene acaulis, espèce gynodioïque, chez qui les femelles ont bien un meilleur succès reproducteur sur la durée de la vie, mais pas d'avantage en survie d'une année sur l'autre (Morris et Dauk, 1998).

Une étude conduite sur des individus d'une même cohorte et suivis sur plusieurs années peut permettre d'estimer les paramètres démographiques et d'évaluer l'importance relative de la fertilité, croissance et survie.

3. Le déterminisme du sexe. A court terme, les génotypes des descendants issus de croisements contrôlés seront vérifiés ce qui permettra d'établir les sexe-ratios dans ces descendances. Ces données nous permettront d'inférer des hypothèses sur le déterminisme génétique de cette espèce.

4. Enfin, une autre approche consiste à étudier l'influence du système de reproduction (androdioïque, dans ce cas) sur les paramètres de structuration de population, et les tailles efficaces nucléaire et cytoplasmique. Cette approche a déjà été menée dans le cas d'espèces gynodioïques (modèle de V. Laporte *et al.* (1998)). Un modèle similaire, adapté au cas de l'androdioécie peut être développé, et des données obtenues à l'aide des marqueurs nucléaires (microsatellites) et cytoplasmiques (RFLP) mis au point au laboratoire chez *Phillyrea angustifolia*.

Bibliographie

Bibliographie

- Adams WT, Birkes DS (1989) Mating patterns in seed orchards. 20th Southern forest tree improvement conference, Charleston, South Carolina: 75-86
- Adams WT, Griffin AR, Moran GF (1992) Using paternity analysis to measure effective pollen dispersal in plant population. *The American Naturalist*, **140**, 762-780.
- Akimoto J, Fukuhara T, Kikuzawa K (1999) Sex ratios and genetic variation in a functionally androdioecious species, *Schizopepon bryoniaefolius* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany*, **86**, (6), 880-886.
- Anderson GJ, Symon DE (1989) Functional dioecy and andromonoecy in *Solanum*. *Evolution*, **43**, (1), 204-219.
- Arizmendi MC, Dominguez CA, Dirzo R (1996) The role of an avian nectar robber and of hummingbird pollinators in the reproduction of two plant species. *Functionnal Ecology*, **10**, 119-127.
- Armenise V (1956) Sull'aborto dell'ovario nella *Phillyrea latifoliai* L. *Nuovo Giornale Botanico Italiano*, **63**, 444-445.
- Armenise V (1957) Contributo alla conoscenza dello sviluppo embriologico di *Phillyrea latifolia* L. *Nuovo Giornale Botanico Italiano*, **64**, 297-318.
- Aronne G, Wilcock CC (1994) Reproductive characteristics and breeding system of shrubs of the Mediterranean region. *Functionnal Ecology*, **8**, 69-76.
- Arroyo MTK, Raven PH (1975) The evolution of subdioecy in morphologically gynodioecious species of *Fuchsia* sect. *Encliandra* (Onagraceae). *Evolution*, **29**, 500-511.
- Atlan A (1991) Sexe et hérédité maternelle: évolution de la stérilité mâle chez *Thymus vulgaris* L. thèse de doctorat. Montpellier II.
- Baker HG (1955) Self-compatibility and establishment after 'long-distance' dispersal. *Evolution*, **9**, 347-349.
- Bawa KS (1980) Evolution of dioecy. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**, 15-39.
- Bawa KS, Beach JH (1981) Evolution of sexual systems in flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **68**, 254-274.
- Bawa KS, Penny DR, Beach JH (1985) Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. *American Journal of Botany*, **72**, 331-345.
- Beatty J (1992) Fitness: theoretical context. In: *Keywords in evolutionary biology* (E. Fox Keller and E. A. Lloyd). Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Bertin RI (1988) Paternity in plants. In: *Plant Reproductive Ecology: Patterns and Strategies* (J. Lovett Doust and L. Lovett Doust). Oxford University Press, Oxford.

- Boshier DH, Chase MR, Bawa KS (1995) Population genetics of *Cordia alliodora* (Borraginaceae), a neotropical tree. 3. Gene flow, neighborhood, and population substructure. *American Journal of Botany*, **82**, (4), 484-490.
- Broyles SB, Schnabel A, Wyatt R (1994) Evidence for long-distance pollen dispersal in milkweed (*Asclepias exaltata*). *Evolution*, **48**, (4), 1032-1040.
- Broyles SB, Wyatt R (1991) Effective pollen dispersal in a natural population of *Asclepias exaltata*: the influence of pollinator behaviour, genetic similarity, and mating success. *The American Naturalist*, **138**, (5), 1239-1249.
- Brewbaker JL (1957) Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. *Journal of Heredity*, **48**, 271-277.
- Brewbaker JL, Majumder SK (1959) Cultural studies of the pollen population effect and self-incompatibility inhibition. *American Journal of Botany*, **48**, 457-464.
- Bull JJ (1987) Sex determining mechanisms: an evolutionary perspective. In: *The evolution of sex and its consequences* (S. C. Stearns). Birkhauser Verlag, Basel, Boston.
- Burczyk J, Adams WT, Shimizu JY (1996) Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon) stand. *Heredity*, **77**, 251-260.
- Burczyk J, Prat D (1997) Male reproductive success in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: the effects of spatial structure and flowering characteristics. *Heredity*, **79**, 638-647.
- Campbell C (1922) Sulla riduzione dei costituenti il pistillo nella *Phillyrea media* L. *Annali di Botanica*, **15**, 285-288.
- Chakraborty R, Meagher TR, Smouse PE (1974) Exclusion of paternity: the current state of the art. *American Journal of Human Genetics*, **26**, 477-488.
- Chakraborty R, Meagher TR, Smouse PE (1988) Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. *Genetics*, **118**, 527-536.
- Charlesworth B, Charlesworth D (1978) A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *The American Naturalist*, **112**, (988), 975-997.
- Charlesworth D (1984) Androdioecy and the evolution of dioecy. *Biological Journal of the Linnaean Society*, **23**, 333-348.
- Charnov EL, Maynard-Smith J, Bull JJ (1976) Why be an hermaphrodite? *Nature*, **263**, 125-126.
- Chase MR, Moller C, Kesseli R, Bawa KS (1996) Distant gene flow in tropical trees. *Nature*, **383**, 398-399.
- Clos D (1906) Du genre *Phillyrea*, de la famille des Oléinées. *Bulletin de la Société botanique de France*, **53**, (4), 357-368.
- Cosmides LM, Tooby J (1981) Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *Journal of Theoretical Biology*, **89**, 83-129.

- Couvet D, Atlan A, Belhassen E, Gliddon C, Gouyon PH, Kjellberg F (1990) Co-evolution between symbionts: the case of cytoplasmic male-sterility in higher plants. In: *Oxford survey in evolutionary biology* (D. Futuyma and J. Antonovics). Oxford university press, oxford.
- Couvet D, Ronce O, Gliddon C (1998) Maintenance of nucleo-cytoplasmic polymorphism in a metapopulation: the case of gynodioecy. *The American Naturalist*, **152**, 59-70.
- Crow JF, Kimura M (1963) The theory of genetic loads. *Proceedings of the XI International Congress of Genetics*, **3**, 495-506.
- Cuevas J, Rallo L (1990) Response to cross-pollination in olive trees with different levels of flowering. *Acta Horticulturae*, **286**, 179-182.
- Cuguen J, Wattier R, Saumitou-laprade P, Forcioli D, Mörchen M, Van-Dijk H, Vernet P (1994) Gynodioecy and mitochondrial DNA polymorphism in natural populations of *Beta vulgaris* ssp *maritima*. *Genetics Selection Evolution*, **26**, 87-101.
- Darwin C (1859) *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, London.
- Darwin C (1877) *The different forms of flowers on plants of the same species*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Dawes HE, Berlin DS, Lapidus DM, Nusbaum C, Davis TL, Meyer BJ (1999) Dosage compensation proteins targeted to X chromosomes by a determinant of hermaphrodite fate. *Science*, **284**, 1800-1804.
- Dawson IK, Waugh R, Simons AJ, Powell W (1997) Simple sequence repeats provide a direct estimate of pollen-mediated gene dispersal in the tropical tree *Gliricidia sepium*. *Molecular Ecology*, **6**, 179-183.
- Delannay X (1978) La gynodioécie chez les angiospermes. *Naturalistes Belges*, **59**, 137-147.
- Delph LF (1990a) The evolution of gender dimorphism in New Zealand *Hebe* (Scrophulariaceae) species. *Evolutionary Trends in Plants*, **4**, 85-97.
- Delph LF (1990b) Sex-differential resource allocation patterns in the subdioecious shrub *Hebe subalpina*. *Ecology*, **71**, 1342-1351.
- Desfeux C (1996) L'évolution des systèmes de reproduction chez les plantes à fleurs: modélisation et approches expérimentales sur des espèces du genre *Silene*. thèse de doctorat. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecologie générale et production végétales.
- Desplanque B (1994) Variabilité cytoplasmique chez *Phillyrea* (Oleaceae). Contribution à l'étude 1. du poaradoxe de l'androdioécie chez *Phillyrea angustifolia* 2. des relations de *P. angustifolia* avec *P. latifolia* et *P. media*. DEA. Université Montpellier II.
- Despres L, Manicacci D (soumis) Is the alpine lily *Lloydia serotina* androdioecious?
- Devlin B, Ellstrand NC (1990a) The development and application of a refined method for estimating gene flow from angiosperm paternity analysis. *Evolution*, **44**, (2), 248-259.

- Devlin B, Ellstrand NC (1990b) Male and female fertility variation in wild radish, a hermaphrodite. *The American Naturalist*, **136**, (1), 87-107.
- Devlin B, Roeder K, Ellstrand NC (1988) Fractional paternity assignment: theoretical development and comparison to other methods. *Theoretical and Applied Genetics*, **76**, 369-380.
- Dommée B, Geslot A, Thompson JD, Reille M, Denelle N (1999) Androdioecy in the entomophilous tree *Fraxinus ornus* (Oleaceae). *New Phytologist*, **143**, (2), in press.
- Donoghue MJ (1989) Phylogenies and the analysis of evolutionary sequences, with examples from seed plants. *Evolution*, **43**, 1137-1156.
- Dow BD, Ashley MV (1996) Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oaks, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology*, **5**, 615-627.
- Dow BD, Ashley MV (1998) High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *Journal of Heredity*, **89**, 62-70.
- Dumas C, Knox RB (1983) Callose and determination of pistil variability and incompatibility. *Theoretical and Applied Genetics*, **67**, 1-10.
- Edwards KC, Jonstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid Research*, **19**, 1349.
- Elleman CJ, Dickinson HG (1996) Identification of pollen components regulating pollination-specific responses in the stigmatic papillae of *Brassica oleracea*. *New Phytologist*, **133**, 197-205.
- Engel CR, Wattier R, Destombe C, Valero M (1999) Performance of non-motile male gametes in the sea: analysis of paternity and fertilization success in a natural population of a red seaweed, *Gracilaria gracilis*. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **266**, 1879-1886.
- Erickson VJ, Adams WT (1989) Mating success in a coastal Douglas-fir seed orchard as affected by the distance and floral phenology. *Canadian Journal of Forest Research*, **19**, 1248-1255.
- Fisher RA (1941) Average excess and average effect of a gene substitution. *Annals of Eugenics*, **11**, 53-63.
- Frank SA (1989) The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *The American Naturalist*, **133**, 345-376.
- Fritsch P, Rieseberg LH (1992) High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature*, **359**, 633-636.
- Gems D, Riddle DL (1996) Longevity in *Caenorhabditis elegans* reduced by mating but not gamete production. *Nature*, **379**, (6567), 723-725.
- Gerber C, Kieffer H (1896) Androdioecie du *Phillyrea angustifolia* L. et essai sur la filiation des *Phillyrea* de la région méditerranéenne. *Bulletin Scientifique Français et Belge*, **31**, 236-244.
- Graham SW, Barrett SCH (1995) Phylogenetic systematics of Pontederiales: implications for breeding-system evolution. In: *Monocotyledons: systematics and evolution* (P. J. Rudall, P. J. Cribb, D. F. Cutler and C. J. Humphries). Royal botanical gardens, Kew.

- Hodgkin J, Barnes TM (1991) More is no better: brood size and population growth in a self-fertilizing nematode. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **246**, (1315), 19-24.
- Hurst LD, Atlan A, Bengtsson BO (1996) Genetic conflicts. *The Quarterly Review of Biology*, **71**, (3), 317-364.
- Ishida K, Hiura T (1998) Pollen fertility and flowering phenology in an androdioecious tree, *Fraxinus lanuginosa* (Oleaceae), in Hokkaido, Japan. *International Journal of Plant Sciences*, **159**, (6), 941-947.
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, (10), 424-429.
- Jeandroz S, Roy A, Bousquet J (1997) Phylogeny and phylogeography of the circumpolar genus *Fraxinus* (Oleaceae) based on the internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **7**, (2), 241-251.
- Johnson LAS (1957) A review of the family Oleaceae. *Contrib. from the N.S.W. National herbarium*, **2**, (26), 395-418.
- Kaufman SR, Smouse PE, Alvarez-Buylla ER (1998) Pollen-mediated gene flow and differential male reproductive success in a tropical pioneer tree, *Cecropia obtusifolia* Bertol. (Moraceae): a paternity analysis. *Heredity*, **81**, 164-173.
- Kaul MLH (1988) *Male sterility in higher plants. Monographs on Theoretical and Applied genetics 10*. Springer Verlag, Berlin.
- Knoll L (1995) Mating behaviour and time budget of an androdioecious crustacean, *Eulimnadia texana* (Crustacea: Conchostraca). *Hydrobiologia*, **298**, 73-81.
- Knoll L, Zucker N (1995a) Is sexual selection operating in the androdioecious clam shrimp, *Eulimnada texana* (Crustacea: Conchostraca)? *Hydrobiologia*, **298**, 67-72.
- Knoll L, Zucker N (1995b) Selfing versus outcrossing in the androdioecious shrimp *Eulimnadia texana* (Crustacea, Conchostraca). *Hydrobiologia*, **298**, 83-86.
- Lepart J, Debussche M (1991) Invasion process as related to succession and disturbance. In: *Biogeography of Mediterranean invasions* (R. H. Groves and F. Di Castri). Cambridge University Press, Cambridge.
- Lepart J, Dommée B (1992) Is *Phillyrea angustifolia* L. (Oleaceae) an androdioecious species? *Botanical Journal of the Linnean Society*, **108**, 375-387.
- Leslie JF, Klein KK (1996) Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. *Genetics*, **144**, 557-567.
- Lewis D (1942) The evolution of sex in flowering plants. *Biological Review*, **17**, 46-67.
- Liston A, Rieseberg LH, Elias TS (1990) Functional androdioecy in the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature*, **343**, 641-642.
- Lloyd DG (1975) The maintenance of gynodioecy and androdioecy in angiosperms. *Genetica*, **45**, 325-339.

- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, **7**, 639-655.
- Maurice S (1992) L'évolution de la dioécie, aspects théoriques et aspects expérimentaux sur le genre *Silene*. Thèse de doctorat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- Maurice S, Belhassen E, Couvet D, Gouyon P-H (1994) Evolution of dioecy: can nuclear-cytoplasmic interactions select for maleness? *Heredity*, **73**, 346-354.
- Maynard Smith J (1971) What use is sex? *Journal of Theoretical Biology*, **30**, 319-335.
- Maynard Smith J (1978) *The evolution of sex*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Maynard Smith J (1989) *Evolutionary genetics*. Oxford University Press, New York.
- Meagher TR (1986) Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of the most-likely male parents. *The American Naturalist*, **128**, (2), 199-215.
- Michod RE, Levin BR (1988) *The evolution of sex: an examination of current ideas*. Sinauer Associates INC Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Mogensen HL (1996) The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *Amer J Bot*, **83**, (3), 383-404.
- Molau U (1992) On the occurrence of sexual reproduction in *Saxifraga cernua* and *S. foliosa* (Saxifragaceae). *Nordic Journal of Botany*, **12**, 197-203.
- Molau U, Prentice HC (1992) Reproductive system and population structure in three arctic *Saxifraga* species. *Journal of Ecology*, **80**, 149-161.
- Morris WF, Doak DF (1998) Life history of the long-lived gynodioecious cushion plant *Silene acaulis* (Caryophyllaceae), inferred from size-based population projection matrices. *American Journal of Botany*, **85**, (6), 784-793.
- Muenchow GE (1998) Subandrodioecy and male fitness in *Sagittaria lancifolia* subsp. *lancifolia* (Alismataceae). *American Journal of Botany*, **85**, (4), 513-520.
- Muller HJ (1932) Some genetic aspect of sex. *The American Naturalist*, **66**, 118-138.
- Nason JD, Herre EA, Hamrick JL (1996) Paternity analysis of the breeding structure of strangler fig populations: Evidence for substantial long-distance wasp dispersal. *J Biogeogr*, **23**, (4), 501-512.
- Niklas KJ (1997) *The evolutionary biology of plants*. The University of Chicago Press, Chicago and London.
- Ornduff R (1972) The breakdown of trimorphic incompatibility in *Oxalis* section *Corniculatae*. *Evolution*, **26**, 52-65.
- Otto SP, Sassaman C, Feldman MW (1993) Evolution of sex determination in the conchostracan shrimp *Eulimnadia texana*. *The American Naturalist*, **141**, (2), 329-337.
- Pandey KK (1979) Overcoming incompatibility and promoting genetic recombination in flowering plants. *New Zealand Journal of Botany*, **17**, 645-663.
- Pannell J (1997a) The maintenance of gynodioecy and androdioecy in a metapopulation. *Evolution*, **51**, (1), 10-20.

- Pannell J (1997b) Mixed genetic and environmental sex determination in an androdioecious population of *Mercurialis annua*. *Heredity*, **78**, 50-56.
- Pannell J (1997c) Variation in sex ratios and sex allocation in androdioecious *Mercurialis annua*. *Journal of Ecology*, **85**, 57-69.
- Pannell J (1997d) Widespread functional androdioecy in *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae). *Biological Journal of the Linnaean Society*, **61**, (1), 95-116.
- Pannell JR (1995) Models of androdioecy and studies on *Mercurialis annua* L. Ph. D. diss. Oxford, London, England.
- Paul D (1992) Fitness: historical perspectives. In: *Keywords in evolutionary biology* (E. Fox Keller and E. A. Lloyd). Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR, Barrett JA (1995) Nonamplifying alleles at microsatellite loci : a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, **4**, 249-252.
- Philbrick CT, Rieseberg LH (1994) Pollen production in the androdioecious *Datisca glomerata* (Datiscaceae): Implications for breeding system equilibrium. *Plant Species Biology*, **9**, 43-46.
- Piquot Y, Saumitou-Laprade P, Petit D, Vernet P, Epplen JT (1996) Genotypic diversity revealed by allozymes and oligonucleotide DNA fingerprinting in French populations of the macrophyte *Sparganium erectum*. *Molecular Ecology*, **5**, (2), 251-258.
- Platt TR, Brooks DR (1997) Evolution of the Schistosomes (Digenea: Schistosomatoidea): the origin of dioecy and colonization of the venous system. *Journal of Parasitology*, **83**, (6), 1035-1044.
- Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR (1993) Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, **8**, (8), 285-288.
- Reboud X, Zey C (1994) Organelle inheritance in plants. *Heredity*, **72**, 132-140.
- Regel C (1949) Etudes biométriques sur le genre *Phillyrea*. *Bulletin de la Société botanique de France, Mémoires*, 20-38.
- Richards AJ (1997) *Plant breeding systems*. Chapman & Hall, London, UK.
- Rieseberg LH, Hanson MA, Philbrick CT (1992) Androdioecy is derived from dioecy in Datiscaceae: evidence from restriction site mapping of PCR-amplified chloroplast DNA fragments. *Systematic Botany*, **17**, (2), 324-336.
- Rieseberg LH, Philbrick CT, Pack PE, Fritsch P (1993) Inbreeding depression in androdioecious populations of *Datisca glomerata* (Datiscaceae). *American Journal of Botany*, **80**, (7), 757-762.
- Ritland K, El Kassaby YA (1985) The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas fir as shown by an efficient multilocus model. *Theoretical and Applied Genetics*, **71**, 375-384.
- Roeder K, Devlin B, Lindsay BG (1989) Application of maximum likelihood methods to population genetics data for the estimation of individual fertilities. *Biometrics*, **45**, 363-379.

- Ronfort J (1995) Evolution des modes de reproduction, re-allocation des ressources et consanguinité. Approche théorique et expérimentale chez *Daucus carota* L. Thèse de doctorat. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ressources génétiques et amélioration des plantes.
- Ross MD (1981) Five evolutionary pathways to subdioecy. *The American Naturalist*, **119**, (3), 297-318.
- Sassaman C (1995) Sex determination and evolution of unisexuality in the Conchostraca. *Hydrobiologia*, **298**, 45-65.
- Sassaman C, Weeks SC (1993) The genetic mechanism of sex determination in the conchostracan shrimp *Eulimnadia texana*. *The American Naturalist*, **141**, (2), 314-328.
- Saumitou-Laprade P, Cuguen J, Vernet P (1994) Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleocytoplasmic conflict. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, (11), 431-435.
- Saumitou-Laprade P, Piquot Y, Bernard J, Vrieling K (1999a) Plant DNA fingerprinting and profiling. In: *DNA profiling and DNA fingerprinting* (J. T. Epplen and T. Lubjuhn). Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.
- Saumitou-Laprade P, Vassiliadis C, Epplen JT, Hardt C (1999b) Isolation of microsatellite loci for paternity testing in *Phillyrea angustifolia* L. (Oleaceae). *Molecular Ecology*, **in press**,
- Schnabel A (1998) Parentage analysis in plants: mating systems, gene flow, and relative fertilities. In: *Advances in Molecular Ecology* (G. R. Carvalho). IOS Press,
- Schnabel A, Hamrick JL (1995) Understanding the population genetic structure of *Gleditsia triacanthos* L. : the scale and pattern of pollen gene flow. *Evolution*, **49**, (5), 921-931.
- Schoen DJ, Stewart SC (1986) Variation in male reproductive investment and male reproductive success in white spruce. *Evolution*, **40**, (6), 1109-1120.
- Schultz ST (1994) Nucleo-cytoplasmic male sterility and alternative routes to dioecy. *Evolution*, **48**, 1933-1945.
- Sebastian C (1956) *Etude du genre Phillyrea Tournefort*.
- Sennen F (1935) Le genre *Phillyrea*. *Bulletin de la Société Dendrologique de France*, **95**, 45-63.
- Smouse PE, Meagher TR (1994) Genetic analysis of male reproductive contributions in *Chamaelirium luteum* (L.) Gray (Liliaceae). *Genetics*, **22**, 369-370.
- Snieszko R, Winiarczyk K (1996) Pollen tube incompatibility reaction on the stigma in selfpollinated *Sinapis alba* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **65**, (1-2), 101-105.
- Snow AA, Lewis PO (1993) Reproductive traits and male fertility in plants: empirical approaches. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 331-351.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) *Biometry*. W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- Spencer SC, Rieseberg LH (1995) The importance of flowering time and flower number in the relative fitness of males and hermaphrodites in *Datisca glomerata* (Datisceae). *Plant Species Biology*, **10**, 65-69.
- Stacy EA, Hamrick JL, Nason JD, Hubbell SP, Foster RB, Condit R (1996) Pollen dispersal in low-density populations of three neotropical tree species. *The American Naturalist*, **148**, (2), 275-298.

- Stearns SC (1987) *The evolution of sex and its consequences*. Birkhauser Verlag, Basel, Boston.
- Strasberg D (1987) Ecologie de l'invasion de *Phillyrea angustifolia* en Camargue (Tour du Valat). mémoire de fin d'études. CEFE, ENITA Dijon.
- Strasberg D (1988) Androdioécie et dynamique de populations chez *Phillyrea angustifolia* en Camargue. DEA Sciences de l'Evolution et Ecologie. USTL, EPHE, INAPG.
- Streiff R (1998) Structure génétique spatiale et flux polliniques dans une chênaie mixte *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. et *Quercus robur* L. Université des sciences et techniques du Languedoc. Biologie de l'évolution et écologie.
- Streiff R, Ducouso A, Lexer C, Steinkellner H, Gloessl J, Kremer A (1999) Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Molecular Ecology*, **8**, 831-841.
- Swensen SM, Luthi JN, Rieseberg LH (1998) Datisceae revisited: monophyly and the sequence of breeding system evolution. *Systematic Botany*, **23**, 157-169.
- Sytsma KJ, Smith JF, Berry PE (1991) The use of chloroplast DNA to assess biogeography and evolution of morphology, breeding systems and flavonoids in *Fuchsia* sect. *Skinnera* (Onagraceae). *Systematic Botany*, **16**, 257-269.
- Taktajhan A (1969) *Flowering plants, origin and dispersal*. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Thompson EA (1975) The estimation of pairwise relationships. *Annals of Human Genetics*, **39**, (173-188),
- Thompson EA (1976) Inference of genealogical structure. *Social Science Information*, **15**, 477-526.
- Traveset A (1994) Reproductive biology of *Phillyrea angustifolia* L. (Oleaceae) and effect of galling-insects on its reproductive output. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **114**, 153-166.
- Uyenoyama MK (1984) On the evolution of parthenogenesis: a genetic representation of the "cost of meiosis". *Evolution*, **38**, 87-102.
- Valiente-Banuet A, Rojas-Martinez A, del Coro Arizmendi M, Davila P (1997) Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, central Mexico. *American Journal of Botany*, **84**, (4), 452-455.
- Vassiliadis C (1995) Etude du succès reproducteur mâle chez une espèce androdioïque: *Phillyrea angustifolia* Efficacité de pollinisation et recherche de marqueurs moléculaires. Montpellier II.
- Vekemans X, Schierup MH, Christiansen FB (1998) Mate availability and fecundity selection in multi-allelic self-incompatibility systems in plants. *Evolution*, **52**, (1), 19-29.
- Vrieling K, Saumitou-Laprade P, Meelis E, Epplen JT (1997) Multilocus DNA fingerprintings in the plant *Cynoglossum officinale* L. and their use in the estimation of selfing. *Molecular Ecology*, **6**, 587-593.
- Wallander E, Albert VA (1999) Phylogeny of Oleaceae based on rps16 and trnL-F sequence data. XVI International Botanical Congress, St Louis Abstracts: 415

- Webb CJ (1979) Breeding systems and the evolution of dioecy in New Zealand Apioid Umbelliferae. *Evolution*, **33**, 662-672.
- Weeks SC, Crosser BR, Bennett R, Gray M, Zucker N (submitted) Maintenance of androdioecy in the freshwater shrimp, *Eulimnadia texana*: estimates of inbreeding depression in two populations. *Evolution*,
- Weeks SC, Marcus V, Crosser BR (1999) Inbreeding depression in a self-compatible, androdioecious crustacean, *Eulimnadia texana*. *Evolution*, **53**, (2), 472-483.
- Weir BS (1996) Individual identification. In: *Genetic data analysis II* Sinauer associates, Inc, Sunderland, Massachusetts.
- Weller SG, Wagner WL, Sakai AK (1995) A phylogenetic analysis of *Schieda* and *Alsinidendron* (Caryophyllaceae: Alsinoideae): implications for the evolution of the breeding systems. *Systematic Botany*, **20**, 315-337.
- Werren JH, Skinner SW, Charnov EL (1981) Paternal inheritance of a daughterless sex ratio factor. *Nature*, **293**, 467.
- Werren JH, van der Assem J (1986) Experimental analysis of a paternally inherited extrachromosomal factor. *Genetics*, **114**, 217-233.
- Westergaard M (1958) The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Advances in Genetics*, **9**, 217-281.
- Williams GC (1975) *Sex and evolution*. Princeton University Press, Princeton.
- Wolf DE, Rieseberg LH, Spencer SC (1997) The genetic mechanism of sex determination in the androdioecious flowering plant, *Datisca glomerata* (Datiscaceae). *Heredity*, **78**, 190-204.
- Wood WB (1988) *The nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Yampolsky C, Yampolsky H (1922) Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. *Bibliotheca Genetica*, **3**, 1-62.
- Zucker N, Cunningham M, Adams HP (1997) Anatomical evidence for androdioecy in the clam shrimp *Eulimnadia texana*. *Hydrobiologia*, **359**, 171-175.

Annexes

Annexes

Annexe 1. Tableau des caractéristiques des espèces androdioïques

Dans ces tableaux, je présente les caractéristiques détaillées concernant le système de reproduction des sept espèces d'Angiospermes androdioïques déjà présentées dans le tableau 1, de trois autres espèces d'Angiospermes dont le pollen des hermaphrodites n'a pas été testé, et de trois espèces animales et d'une espèce de champignon pour lesquels l'androdioécie a été montrée.

Légendes et Abréviations:

M: mâle

F: femelle

Fl: fleur

H: hermaphrodite

Ind: individu

Nb: nombre

Open : pollinisation libre

Self: autopolinisation

Pop: population

RAPD: random amplified polymorphism detection

Tristylie: 3 morphes:

- 'Long': style long, étamines et pollen 'short' et 'mid'
- 'Mid': style moyen, étamines et pollen 'long' et 'short'
- 'Short': style court, étamines et pollen 'long' et 'mid'.

Espèce	<i>Datisca glomerata</i>	<i>Mercurialis annua</i>	<i>Schizopepon bryoniaefolius</i>
Système de reproduction	androdioécie	androdioécie	androdioécie
Références bibliographiques	(Liston <i>et al.</i> 1990; Rieseberg <i>et al.</i> 1993; Philbrick & Rieseberg 1994; Wolf <i>et al.</i> 1997; Swensen <i>et al.</i> 1998)	(Pannell 1995; Pannell 1997a; Pannell 1997b)	(Akimoto <i>et al.</i> 1999)
Type biologique, répartition géographique	Géophyte herbacée pérenne, à longue durée de vie. Plante de 1 à 2,5 m. Ripisylve. Sud-Ouest des Etats-Unis.	Annuelle, rudérale. Large répartition: Europe et Méditerranée; Sud de l'Espagne et du Portugal, Nord du Maroc: populations 6n androdioïques (Pannell 1997c).	Annuelle grimpante. En bordure de forêts décidues. Asie orientale (Japon, Corée, Sakhaline, Nord de la Chine), au pied des montagnes du Japon.
Taille des populations et sexe-ratio	Petites populations, ind largement dispersés. 10 populations de Californie (397 ind) M: 0 - 25% (Liston <i>et al.</i> 1990)	4 sites en Espagne: forte densité, M: 0 - 38% (<30% en moyenne) (Pannell 1997c). 9 sites, transect de quadrats, M: 0 - 30%: faible variation temporelle, augmente avec la densité (Pannell 1997b).	11 populations (81 - 221 ind; 1671 ind) M: 0 - 28.3%, 6 sans M.
Morphologie des fleurs, des inflorescences	Apétale à calice court. Fleurs M :pédicelles longs et 6 à 20 étamines. Fleurs H : 3 étamines, un ovaire tri-carpellé, long style pour la réception du pollen, protogynes.	<u>Des ind M et des ind monoïques (cosex ou H)</u> <u>Cosex</u> : monoïques, inflorescences M et F. Fleurs F : sessiles, 3 tépales verts, stigmas plumeux, 3 ovules (3 ou 2 graines, pas de limitation de pollen), fleurs subsessiles entourées d'une spirale de fleurs M. Mâles : inflorescences pédonculées, dressées; fleurs M: 3 tépales verts, pédoncule long (<80 cm), 10 à 20 anthères insérées en spirale (Pannell 1997c).	Petites. Fleurs H : solitaires, visibles, axillaires, 3 étamines, style court: stigmate proche des anthères, 3 ovules (jusqu'à 3 graines par fruit). Fleurs M : inflorescences paniculées de 10-20 fleurs discrètes, 3 étamines, pas de pistil.
Pollen (quantité, viabilité)	<u>Quantité de pollen/fleurs</u> M:H = 0,89:1 (Philbrick & Rieseberg 1994); poids des plantules plus élevé après pollinisation M vs. H (Rieseberg <i>et al.</i> 1993).	<u>Taille du pollen et viabilité</u> (test FDA): pas de différence. Fertilité du pollen H vérifiée (5 croisements M et H) (Pannell 1997c).	Fertilité (coloration au coton blue) et morphologie identique (très peu de grains vides).
Type de pollinisation	Anémophile. Protogynie des H; floraison plus précoce des M (Spencer & Rieseberg 1995)	Anémophile. Forte protogynie des H: évitement de l'autofécondation (Pannell 1997c). Dispersion du pollen mâle favorisé par architecture des inflorescences.	Entomophile: insectes attirés par pollen abondant (des fleurs M surtout ?)

Espèce	Datisca glomerata	Mercurialis annua	Schizopepon bryoniaefolius
Allocation au sexe	<u>Fonction mâle</u> (M:H): Nombre de fleurs (env 25000/ind; biomasse) 1:1 (Spencer & Rieseberg 1995). Anthères (M:H): 3,29:1 (Philbrick & Rieseberg 1994); Pollen/anthère: 0,89:1 (Spencer & Rieseberg 1995). Avantage mâle en fertilité résultant: 2,93. <u>Fonction femelle</u> : graines petites et nombreuses, quantité variable.	<u>Fonction mâle</u> (M:H): Production de fleurs staminées/poids sec: 6,09:1 (2,33 - 15,5), H: allocation mâle: 0 à 0,4; M: augmente avec densité, H: diminue avec densité, augmente avec ombre (Pannell 1997a); Avantage mâle en fertilité résultant: 4 à 10 (Pannell 1997c). <u>Fonction femelle</u> : allocation femelle relative des H: de 0,6 à 1,0 (associée à la taille: petit = femelle; augmente avec densité; diminue avec l'ombre) (Pannell 1997c; Pannell 1997a). M: peuvent devenir H tardifs, en faible densité.	Avantage mâle possible (non mesuré): nombre de fleurs/inflorescences et attraction des pollinisateurs.
Autofécondation et dépression de consanguinité	Fis = 0.617 (23 pop, 6 loci allozymiques), I = 0,847; <u>Taux d'autofécondation</u> = 8% à 35% (2 pop, RAPD) (Fritsch & Rieseberg 1992) <u>Dépression de consanguinité</u> : poids des graines: delta=0,16; poids des plantules: 0,17; forte variabilité inter-individu (Rieseberg et al. 1993)	Autofertile : expérience avec 5 H isolés (Pannell 1997c), possible en faible densité (colonisation).	Autofertile: 16 H ensachés: 8 donnent des graines. Fis (4 loci enzymatiques): 0.978 et 0.963 pour 2 pop H, 0.78 à 0.39 pour 4 pop androdioïques: fortement autogame, surtout si pas de M dans la pop.
Survie et croissance végétative; reproduction asexuée		Les M sont plus grands que les H (1.5)	
Déterminisme du sexe	Pas de labilité du sexe observée sur le terrain (Rieseberg et al. 1993); <u>Déterminisme génétique</u> : deux loci nucléaires; stérilité femelle récessive. M: aabb homozygote récessif aux deux loci; liaison entre deux loci: 36 ou 6,7 cM (Wolf et al. 1997)	Ploïdie: 2n = dioïques, 4n: monoïques surtout; 6n: monoïques et androdioïques, 8n et plus: monoïques. Androdioïque: grande stabilité au cours de la floraison (intra ind) et de fréquence des M entre années. <u>Déterminisme génétique</u> : 1 locus nucléaire; stérilité femelle dominante. <u>Déterminisme environnemental</u> : 1. forte densité: M: plus d'allocation mâle, et H: plus d'allocation femelle; faible densité: M: peuvent devenir 'late cosex', et H: plus d'allocation mâle. 2. taille des individus: grands H sont plus mâles (Pannell 1997a).	probablement nucléaire. M: Fis proche de 0, H: Fis très élevé.
Evolution de l'androdioécie	Evolution de la dioécie vers l'hermaphrodisme: état transitoire, petites populations à individus dispersés; phylogénie des Datisceae: D. cannabina et Octomeles, Tetrameles dioïques (Rieseberg et al. 1992); mais phylogénie plus complète: pas de conclusion possible (Swensen et al. 1998)	<u>Evolution à partir de la dioécie</u> (cf. 6 autres espèces de Mercuriales pérennes et dioïques, et la plupart des Euphorbiacées, fleurs unisexuées). Maintien de l'androdioécie par une sélection de la cosexualité biaisée en faveur de la fonction femelle, capable de s'autoféconder en faible densité, des fleurs mâles pédonculées, des mâles devenant H en faible densité.	Fort Gst (0.688) entre pop: dérive génétique, fluctuation de taille, et très faible flux de gènes entre pop: la stérilité femelle ne s'étendra probablement pas. Taux d'allofécondation dépend du taux de M: pas pris en compte dans les modèles.

Espèce	<i>Fraxinus ornus</i>	<i>Fraxinus lanuginosa</i>	<i>Phillyrea angustifolia</i>
Système de reproduction	androdioécie	androdioécie	androdioécie
Références bibliographiques	(Dommée et al. 1999)	(Ishida & Hiura 1998)	(Strasberg 1988; Lepart & Dommée 1992; Desplanque 1994; Traveset 1994)
Type biologique, répartition géographique	Arbre décidu. Europe centrale et du Sud, en expansion en région méditerranéenne française.	Arbre décidu, abondant mais non dominant sous la canopée des forêts du centre d'Hokkaido (Japon).	Arbuste à feuillage persistant, peut atteindre 4m; garrigue. Méditerranée occidentale.
Taille des populations et sexe-ratio	4 sites, 5 populations (319 ind); M: 48.6 - 52.3%; 50%	3 populations (10 - 175 ind; 202 ind); M: 10 - 49.7%	23 stations en Camargue (23-168 ind, 2412 ind); M: 50% (sauf 3 isolées, M: 30%; et 1 vieille, 78%M) (Strasberg 1988); 3 populations (369 ind) M: 43,3 - 58,2: 50% (Lepart & Dommée 1992); 6 stations (532 ind) M: 50% (sauf 1 : 30%) (cette étude). 3 populations des Baléares (96 ind): M: 20,6 - 38,7% (Traveset 1994).
Morphologie des fleurs, des inflorescences	Inflorescences de plusieurs centaines de fleurs, pétales blancs, nectarifères; 2 étamines de même taille. <u>Fleurs H</u> : pistil, 4 ovules, une graine; fleur <u>Fleurs M</u> : pistil vestigial plus petit.	<u>Inflorescences H</u> : 160.7 fl; <u>inflorescences M</u> : 490.4 fl (3 fois plus); pétales blancs, pas de nectar, 2 étamines. <u>Fleurs H</u> : pistil, 4 ovules, 1 graine, protogyne; <u>Fleurs M</u> : pas de pistil. Floraison synchrone, même durée.	Floraison abondante (plusieurs milliers de fleurs par individu); inflorescences de 4-10 fleurs, à l'aisselle des feuilles de jeunes rameaux, fleurs à deux étamines (même taille; effet individu). <u>Fleurs H</u> : stigmate arrondi et un ovaire bien développé, plus grand. <u>Fleurs M</u> : pas de stigmate, pistillode, et ovaire peu développé.
Pollen (quantité, viabilité)	Morphologie et % pollen avorté identiques. Croisements: pollen H efficace sur 6/7 ind; pollen M sur 6/6 ind; pollen M donne plus de graines que pollen H (sur 2 années et 2 ind).	Morphologie et taille identique; viabilité in vitro: pollen M germe 2,8 à 3,4 fois plus. Fertilité de pollen H vérifiée: pollen H de 12/13 ind germe. Croisements: pollen H donne graines sur 4/5 ind, pollen M sur 5/5; pollen M: 2,66 fois plus de graines.	Quantité de pollen par fleur: M: 24000; H: 28000, forte variabilité inter-individu, non significatif. Nb fleurs par glomérule: M: 7,56; H: 5,96; nb de glomérules par rameau: M: 6,34; H: 4,66 (Strasberg 1988). Pollen M plus poreux (Traveset 1994); pas de différence de viabilité in vitro (Lepart & Dommée 1992).
Type de pollinisation	Entomophile	Entomophile: pollen comme récompense; anémophile	Anémophile
Allocation au sexe		<u>Avantage mâle en fertilité</u> : nb fleurs/inflorescences (3); viabilité du pollen (2,8 - 3,4); soit 8,5-10,4. <u>Avantage en fécondité</u> : nb graines issues de croisements contrôlés: 2,66.	<u>Avantage mâle en fertilité</u> : nb fleurs/inflorescence (1,36); nb inflorescences/rameau (1,27), soit 1,73. <u>Avantage en fécondité</u> : nb de graines/inflorescence issues de croisements contrôlés: 1,93 ; par analyse de paternité : 1,43 (non significatif) (cette thèse).

	<i>Fraxinus ornus</i>	<i>Fraxinus lanuginosa</i>	<i>Phillyrea angustifolia</i>
Autofécondation et dépression de consanguinité	Autofertile: 7/ 8 H ensachés, autopollinisés à la main donnent des fruits, surtout dans une pop. Pas de différence de germination entre graines issues d'autofécondation et d'allofécondation.	Fortement auto-stérile: 5 H ensachés: pas ou très peu de fruits (12-19 fois moins que issus de pollinisation parH): (autoincompatible ou dépression de consanguinité) Fis (5 loci enzymatiques) non nul donc taux d'autofécondation non nul; autofécondation possible en faible densité.	Camargue, Clos des Faisses: 20 H ensachés (20 rameaux): self: 0,05 fruits/fleur; open: 0,30 fruits/fleurs; faiblement autocompatible (Strasberg 1988). Forte autoincompatibilité Individus issus de Gardiole, 13 H ensachés: self: 0,168 fruits/infl (0,034 fruits/fl); open: 1,52 fruits/infl (0,304 fruits/fl).
Survie et croissance végétative; reproduction asexuée		Suggéré mais non mesuré	Nombreux rejets à partir d'un lignotuber (organe de réserve, régénération rapide après perturbation). M plus grands (test significatif dans 3 stations sur 19); effort végétatif mesuré sur 5 plus longues pousses de 20 M et 20 H, M: 110 mm > H: 60 mm (très significatif); meilleure survie en forte densité (hauteur et diamètre; nombre de rejets fins, surface basale des 5 plus gros rejets) (Strasberg 1988).
Déterminisme du sexe	Pas de labilité du sexe; pas de différence de diamètre de tronc: genre indépendant de taille et âge.		Déterminisme non connu. Hypothèse d'une hérédité uniparentale paternelle du facteur stérilité femelle rejetée (Desplanque 1994).
Evolution de l'androdioécie	40 espèces de <i>Fraxinus</i> , dioïques ou polygames. Section <i>Ornus</i> : 5 esp. morphologiquement androdioïques (4 avec pétales, 1 sans; 2 avec étamines H plus courtes) et 1 esp. dioïque, sans pétales. Origine fleur complète ou réduite ?? D'après phylogénie (Jeandroz et al. 1997)	Modèle de Lloyd 1975: avec avantage en viabilité, maintien des M possible. Maintien des étamines H: attire pollinisateurs; faible fertilité du pollen H: pour éviter un 'ovule discounting' à cause de la geitonogamie, et faible fertilité mâle des H attendue si évolue à partir de la dioécie.	Evolution de l'hermaphrodisme vers la dioécie? Le pistillode des fleurs mâles suggère que les fleurs étaient hermaphrodites à l'origine. Les phylogénies existantes des Oléacées ne sont pas assez résolutes pour répondre définitivement à cette question.

Espèce	<i>Phillyrea latifolia</i>	<i>Oxalis suksdorfii</i>	<i>Saxifraga cernua</i>	<i>Lloydia serotina</i>
Système de reproduction	Androdioécie ? Pollen H non testé	androdioécie, tristylie	androdioécie? pollen H non testé	Androdioécie ou andromonoécie?
Références bibliographiques	(Aronne & Wilcock 1994)	(Ornduff 1972)	(Molau 1992; Molau & Prentice 1992)	(Despres & Manicacci soumis), Barbara Jones (BJ) (Wales), Jane Bock (Colorado)
Type biologique, répartition géographique	Buisson Bassin méditerranéen	Herbacée pérenne; forêts. Côte Pacifique, du S de Colombie britannique au N de la Californie.	Herbacée pérenne; bulbes souterrains et parfois courts rhizomes; une seule tige; 2 feuilles basales. Circum-polaire, toundra sub-arctique, prairies alpines humides et tourbières, éboulis humides.	Herbacée pérenne; bulbe, une seule tige, 2 feuilles basales. Habitats pauvres circum-polaires, arctiques et alpins; rare en Grande Bretagne (très isolée).
Taille des populations et sexe-ratio	Un transect de 500 m (Naples) 149 ind : 67% M	Mids (M): 33% des populations env.	8 sites en Laponie; petits groupes séparés de 10-100 individus; majorité des pop: 100% M; 1 pop 0% M, 1 pop 47% M, 1 pop 75% M; 2 pop dans W Groenland: 0% M et 60% M	BJ toutes pop étudiées: fréquence de M élevées. En France: 11 pop alpines, M: très variable, 15,5 - 67,5%, variation spatiale et temporelle.
Morphologie des fleurs, des inflorescences	Nombre de fleur par nœud : M/H : 17.8/12.8 Densité de fleurs par branche : M/H : 8.08/5.95 (1.4) Anthères identiques M/H <u>Fleurs M</u> : ovaire avorté.	<u>Long (H)</u> : faiblement autocompatible; peu de différenciation des deux types de pollen <u>Short (H)</u> : auto-incompatible, légère différenciation de taille de pollen <u>Mid (M)</u> : produit très peu de graines (incompatibilité, avortement); pollen fortement différencié.	Reproduction sexuée rare; une fleur terminale (parfois fl sur branches latérales); 2.0 fl/ind en moyenne (variabilité entre pop et entre année du taux de floraison). 232.5 ovules/fleur en moyenne, H et M. <u>Fleur H</u> : pistil stigmaté développé; 15.3 graines/fruits soit peu de graines/ovules (0.07); <u>Fleur M</u> : pistil (ovules), stigmaté réduit et sec, pas de graines.	Une (rarement deux) fleur par individu. 6 tépales, 6 étamines de même taille. <u>Fleurs M</u> : pas de pistil (ou très court), pas d'ovaire (ou bien avorté). 4 cas: deux fleurs: une H, puis une M. <u>Fleurs H</u> : plus grandes, et sur tige plus longue que M.
Pollen (quantité, viabilité)	Production de pollen/fleur M/H=3/1 Contenu (cotton blue, lactophenol) : 99% normal, Viabilité (diacétate de fluorescéine) : 80%	Pollinisations contrôlées (plusieurs centaines de fleurs): <u>Pollen H</u> : les deux types de pollen 'Long' sont compatibles sur 'Short'; les deux types de pollen 'Short' compatibles sur 'Long'. <u>Pollen M</u> : Mids: pollen des étamines 'Short' compatible sur Short, pollen des étamines 'Long' compatible sur 'Long'.	Morphologie et viabilité (coloration lactophenol et cotton blue): <u>Pollen H</u> : variation continue (0 à 97%, en moyenne moins de 50%); pas de différence. Croisements: pollen M: donne graines sur 3/7 H (9 à 25% graines/ovules); pollen H sur M: pas de graines (5).	BJ: production et viabilité du pollen: pas d'avantage double des M. France: même quantité de pollen par fleur (sauf dans deux pop: effets opposés). Pollinisation contrôlée: pollen M: 22 fruits, pollen H: 26 fruits: même fertilité mâle.
Type de pollinisation	anémophile	Entomophile	Entomophile	Entomophile, nectarifère. Peu de diptères et de fourmis.

	<i>Phillyrea latifolia</i>	<i>Oxalis suksdorfii</i>	<i>Saxifraga cernua</i>	<i>Lloydia serotina</i>
Allocation au sexe	Avantage en fertilité : $1.4 \times 3 = 4.2$	Pas de mesure de quantité de pollen (les Mids devraient produire au moins deux fois plus de pollen que Shorts et Longs car 2 mêmes types de pollen (fonctionnellement) produit par les trois morphes). Pas d'avantage mâle dû à l'incompatibilité.		
Autofécondation et dépression de consanguinité		<u>Autoincompatible</u> . Associé à communautés stables et répartition géographique restreinte (autres Oxalis: autogames, colonisatrices, rudérales, large répartition).	Autoincompatible: 12 H ensachés, 5 H autopollinisés activement: pas de graines. P/O: 217	Pollinisation contrôlée: 4 fruits; plus d'ovules ou graines non développés. Faible P/O ratio: 217 (autogame facultative). Partiellement autocompatible.
Survie et croissance végétative; reproduction asexuée		Forte propagation végétative: plusieurs m ² pour un clone, croissance clonale. Reproduction sexuée rare, associée à perturbation écologique pour installation des plantules.	<u>Reproduction végétative</u> par apomixie; bulbilles à l'aisselle des feuilles caulinaires; beaucoup de populations sans fleurs ni graines.	Seulement 15% des plantes fleurissent: limite de ressources. BJ: <u>reproduction végétative</u> dominante dans toutes les pop, structure type rhizomes issue de bulbe. Pop plus petites, périphériques, avec moins de fleurs.
Déterminisme du sexe		chez <i>O. piceae</i> , <i>O. valdiviensis</i> : Long: ssmm; Mids: ssM-; Short: S---	Non connu. Diversité cytologique: $2n = 24$ à $2n = 72$; polypléide apomictique. Mâles peut-être récessifs (sinon, ils envahiraient la population très vite).	Expression du sexe stable pendant la floraison. 4 ind observés avec deux fleurs, H et M. D'une année sur l'autre, le phénotype sexuel peut changer: espèce plutôt andromonoïque. Probablement facteurs génétiques et environnementaux.
Evolution de l'androdioécie	Ovaires avortés sur fleurs M : origine hermaphrodite Avantage en fertilité des M : allocation des ressources différente, évolution vers la dioécie Limitation des ressources : sélectionne pour la séparation des sexes.	Problème du maintien des Mids (33%) en population. Disparition des Mids (de l'allèle M) et passage à la distylie; perte de différenciation du pollen associée à perte de incompatibilité.	En majorité: pop femelle-stérile, <u>reproduction asexuée</u> . Deux pop avec coexistence M et H: avantage M: bulbilles. Forte variation du genre fonctionnel chez H. Pas pour promouvoir l'allofécondation. Par la reproduction végétative, les mâles augmentent leur valeur sélective tout en restant capables de féconder les H (Richards 1997)	Avantage possible en reproduction végétative et fréquence de floraison (pas mesuré). Andromonoécie: 4 ind à deux fleurs observés. Ressources limitées: production de fleurs M, diminution d'allocation femelle liée à la taille. 1. jeunes ind petits bulbes; 2. hétérogénéité spatiale intra- et inter-population; 3. facteurs climatiques. Productions de fleurs M: attraction d'insectes (rares), intéressant au niveau du clone entier; et 'pollen donation' (fleurs M peu coûteuses). BJ: avantage des M en reproduction végétative (pas mesuré). 16 pop allozymes: faible variation dans petites pop (dérive); pop des pays de Galles: isolées, mais plus grandes: forte variabilité. RAPD: croissance clonale et structure de la pop: maintien de diversité en pop plus larges et plus dispersées.

Espèce	<i>Fuchsia microphylla</i>	<i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i>	<i>Eulimnadia texana</i>
Système de reproduction	Androdioécie? pollen H non testé	Androdioécie? pollen H non testé	androdioécie
Références bibliographiques	(Arroyo & Raven 1975; Arizmendi et al. 1996)	(Valiente-Banuet et al. 1997)	(Otto et al. 1993; Sassaman & Weeks 1993; Knoll 1995; Knoll & Zucker 1995a; Knoll & Zucker 1995b; Zucker et al. 1997; Weeks et al. 1999; Weeks et al. submitted)
Type biologique, répartition géographique	Buisson; Mexique (Sierra de Manantlan); forêt et végétation secondaire.	Cactus en colonne sans branches, jusqu'à 14 m de haut. Dominant dans les zones arides et semi-arides du Mexique central.	Petite crevette, ne vit qu'un an. Habitats d'eau douce éphémères Amérique du Nord.
Taille des populations et sexe-ratio		Forme parfois des forêts de très forte densité (1200 ind/ha, 1680 ind/ha dans zone d'étude). Sexe ratio dans la population: 15.4% M	sexe-ratio: 0 à 40% M (Knoll & Zucker 1995a); moyenne: 25%.
Morphologie des fleurs, des inflorescences	<i>F. microphylla</i> et <i>thymifolia</i> ne sont pas gynodioïques mais subdioïques; 90% des fleurs observées sont femelle-stérile (mâles) (Arroyo & Raven 1975). Floraison toute l'année, chaque fleur: 5 jours. <u>Fleurs M</u> : pas de gynécée, plus longues et plus brillantes; même nombre de visites, mais fleurs M dérobées 4,2 fois plus que fleurs H (20% des visites); pas d'effet du vol de nectar sur le fruit set.	Fleurs M et H: même taille, s'ouvrent une nuit seulement, nectarifères. <u>Fleurs M</u> : gynécée réduit, sans ovules; <u>Fleurs H</u> : stigmaté.	Deux morphotypes bien différenciés, maturité sexuelle à 4-7 jours: M: 2 premières paires d'appendices thoraciques en pince pour saisir les hermaphrodites. H: ovotestes avec tissu testiculaire limité à région postérieure de gonade; même développement de sperme (Zucker et al. 1997). H produit plusieurs milliers d'œufs (100-300 par ponte), résistants, enterrés; éclosent avec humidité et chaleur.
Pollen ou gamètes mâles (quantité, viabilité)	Pollinisation: cross: 19,2; oiseau-mouche: 13 à 16. Pas précisé si pollen M ou H.	germinabilité <i>in vitro</i> testée: 100% pollen de M et d'H produisent des tubes polliniques. Croisements avec pollen de M: donne autant de fruit que open (10 fleurs-10 individus). Pas de croisements avec pollen H.	Même maturation du sperme chez M et H; même taille de ponte (en fonction de taille de l'individu) pour H autofécondé et croisés (Knoll & Zucker 1995b).
Type de pollinisation ou mode de croisements	Pollinisé par des oiseaux-mouches et des bourdons; une espèce voleur de nectar 'illégitime' ne pollinise pas. Dépend absolument des pollinisateurs.	Pollinisé la nuit par les chauve-souris (comme 60% des cactus colonne) à 90%, mais aussi visites diurnes. Dépend absolument des pollinisateurs.	Allofécondation par M seulement Autofécondation des H.
Allocation au sexe		Avantage mâle possible (non mesuré) en nombre de fleurs et quantité de pollen.	<u>Avantage mâle en compatibilité</u> : seuls les M peuvent alloféconder les H (dimorphisme, accouplement). Pas de limitation de sperme des H: peuvent autoféconder 100% de leurs œufs en absence de M.

	<i>Fuchsia microphylla</i>	<i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i>	<i>Eulimnadia texana</i>
Autofécondation et dépression de consanguinité		<p>Autoincompatible. 10 fleurs ensachées, 10 fleurs ensachées puis autopollinisées à la main: pas de graines.</p> <p>Certains cactus colonne sont autocompatibles (mais faible production de graines)</p>	<p>Observation comportement: allofécondation 53% (dure moins longtemps), autofécondation 12%; pas de fertilisation 35%; choix des H (les selfing sont plus vieux). Tailles de ponte self/cross identiques.</p> <p><u>Dépression de consanguinité:</u> 6 pop 0,2 à 0,97 (0,49), positivement corrélé avec fort taux d'H (Sassaman 89). 4 pop (loci enzymatiques) F 0,32 à 0,39, s=0,59 à 0,68; mais encore forte dépression de consanguinité (précoce): 0,41 à 0,47 moy 0,44, pas de purge. 2 pop F=0,32 et F=0,39 mesure de dépression tardive: d=0,68, pas de purge et d=0,50, purge.</p> <p>Modèle de superdominance, sur grand groupe de liaison avec loci du sexe (recombinaison contre-sélectionnée), explique la différence entre les H mono et amphigéniques issus de même selfing (Weeks <i>et al.</i> 1999; Weeks <i>et al.</i> submitted).</p>
Survie et croissance végétative; reproduction asexuée	Autocompatible: sur 16 fleurs (16 ind): self: 4,6 (3 fois moins que cross); cross (mais pas précisé si c'est par du pollen M ou H): 13 à 16; par le 'voleur': 0,2.		H ont meilleure survie que M. Survie relative des M: 0,7 à 0,9
Déterminisme du sexe	Pas de labilité du sexe observée sur les trois années d'étude.	Pas de labilité du sexe sur 2 ans.	Déterminisme nucléaire, un locus, stérilité femelle récessive. H monogénique SS; H amphigénique Ss (peuvent produire M); M ss.
Evolution de l'androdioécie	?	<p>Hyp discutée ici: pas pour outcrossing, mais réallocation de ressources: permet d'augmenter le nombre de fleurs M (Bawa 1980)</p> <p>Androdioécie: étape intermédiaire de l'hermaphrodisme à la dioécie.</p> <p>2 esp. proches: <i>Neobuxbaumia tetetzo</i> et <i>N. macrocephala</i>: hermaphrodites.</p> <p>Très peu de Cactaceae ont un système dioïque ou subdioïque: 4 esp. d'<i>Opuntia</i>, <i>Echinocereus coccineus</i>: dioïques; 2 esp <i>Mamillaria</i>, <i>Selenicereus innersii</i>: gynodioïques; <i>Pachycereus pringlei</i>: trioïque.</p>	<p>Modèle condition de maintien des M (Otto <i>et al.</i> 1993): (maintien de l'allèle s): $a(1-v) > 2s(1-d)$: forte dépression de consanguinité (large d), faible autofécondation (petit s), forte viabilité mâle (petit v), forte fécondité des M (large a). Dans deux pop, avec s=1 et 1-v=0,7-0,9, il faut a>0,9 ou 1,3; plus facile encore si a est fréquence-dépendant.</p> <p>Système déterminisme du sexe ancestral: <i>Eocyzius concavus</i>, gonochorique: F: hétérogamétiques (un locus lié au sexe) Ss, M: homozygotes récessifs ss. Origine: dioécie (Sassaman 1995)</p> <p>Sinon, évolution vers H SS (unisexualité: caractère dérivé indépendant). Ici pas d'allofécondation par des H: les rares M peuvent féconder beaucoup, plus de deux H en moyenne, donc maintien possible des M (même sans évitement d'autofécondation).</p> <p>Evolution plus probable à partir de pop H qui s'autofécondent seulement.</p>

Espèce	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Uterotrema burnsi/kreffti</i>	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Système de reproduction	androdioécie	androdioécie? deux espèces?	androdioécie/ reproduction végétative
Références bibliographiques	(Wood 1988; Hodgkin & Barnes 1991; Gems & Riddle 1996; Dawes <i>et al.</i> 1999)	(Platt & Brooks 1997)	(Leslie & Klein 1996)
Type biologique, répartition géographique	Nématode, durée de vie: 10-20 jours.	Schistosome Spirorchidae. Parasite de la tortue d'eau douce <i>Emydura kreffti</i> .	Ascomycète hétérothallique. Parasite de céréales (maïs).
Taille des populations et sexe-ratio	Mâles très rares, produits en faible nombre par non disjonction du chromosome X.	?	Populations composées de clones (genet) comportant plusieurs individus (ramet); taille efficace de population peut varier 90% à 30%; pop de taille importante avec grande diversité. Sex-ratio: sur trois espèces de <i>G. fujikuroi</i> 60 à 90% de M (femelle-stérile, FS); des souches avec 100% FS.
Morphologie des fleurs, des inflorescences, des organes sexuels		<i>U. kreffti</i> (M): plus grand, possède un testis plus grand, et pas d'œufs utérins (comme une espèce proche). <i>U. burnsi</i> (H): sperme dans réceptacle séminal, nombreux œufs utérins, fonctionnellement hermaphrodite.	Production de gamète mâle: pour reproduction sexuée et propagation végétative; production de structure reproductrices femelles plus coûteuse.
Pollen (quantité, viabilité)	H: sans M, ne peuvent féconder que 80% de leurs œufs: produisent moins de sperme que d'œufs; mais croisés avec M: peut augmenter (x 2) leur succès reproducteur total.		Production de gamètes mâles: sans doute plus importante chez souches FS que chez H, mais non mesurée.
Type de pollinisation ou modalité de croisements	Allofécondation par M seulement, autofécondation majoritaire.		Croisement dépend de 'mating type' (+/-); un des deux doit avoir une fonction femelle.
Allocation au sexe	Avantage mâle en compatibilité: seuls les M peuvent alloféconder les H.		
Autofécondation et dépression de consanguinité	H s'autofécondent d'abord. Participation des M : phylogénie mitochondriale et nucléaire de 28 souches indépendantes; congruence avec exceptions: rôle des M.		possible pour les H.
Survie et croissance végétative; reproduction asexuée	H vivent plus longtemps; durée de vie réduite des M par mating, interaction avec autres M mais ne réduit pas production de gamètes (Gems & Riddle 1996)		Cycle: reproduction asexuée importante, possible via les gamètes mâles. Pendant ce temps, accumulation de mutations FS.

	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Uterotrema burnsi/kreffti</i>	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Déterminisme du sexe	H: XX; M: XO; en fait dépend plus subtilement de la balance des X/A: compensation de dosage; protéines de différenciation sexuelle identifiées (Dawes <i>et al.</i> 1999).	stérilité femelle génétique.	<u>mating type</u> : considéré comme un locus, deux allèles; <u>stérilité femelle</u> : plusieurs locus.
Evolution de l'androdioécie	A partir de population hermaphrodites autofertile (souches), apparition de M et donc de croisements possibles (rôle dans maintien de la diversité? Par rapport aux souches sans M?).	<u>Evolution de hermaphrodisme vers la gonochorie</u> . Apparition de la protandrie; réduction de la fonction mâle des H, réallocation de ressource des H restants vers fonction femelle. H <i>U. burnsi</i> : infection typique dans artérioles puis vers trop gros pour dépôt d'œufs sélectif (spécialisation, division du travail), restent dans le cœur, et étendent leur vie: fonctionnellement M car plus efficace dans croisements avec jeunes H. Sélection pour gène de stérilité femelle, qui s'exprime ensuite plus tôt. Puis avantage de fonction femelle: apparition de stérilité mâle cytoplasmique chez H, et disparition des H contre-sélectionnés.	A partir d'une espèce 'idéale': hermaphrodite autofertile; apparition de souches FS, qui peuvent envahir pop (>50%) par propagation végétative, et évolution vers une espèce 'imparfaite' avec 100% souches FS, sans reproduction sexuée. Balance sex/asex dépend de avantage mâle, du nombre de mutations FS. La reproduction sexuée est assez rare, permet l'accumulation de FS et perte de sexualité.

Bibliographie de l'annexe 1

- Akimoto J, Fukuhara T, Kikuzawa K (1999) Sex ratios and genetic variation in a functionally androdioecious species, *Schizopepon bryoniaefolius* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany*, **86**, (6), 880-886.
- Arizmendi MC, Dominguez CA, Dirzo R (1996) The role of an avian nectar robber and of hummingbird pollinators in the reproduction of two plant species. *Functionnal Ecology*, **10**, 119-127.
- Aronne G, Wilcock CC (1994) Reproductive characteristics and breeding system of shrubs of the Mediterranean region. *Functionnal Ecology*, **8**, 69-76.
- Arroyo MTK, Raven PH (1975) The evolution of subdioecy in morphologically gynodioecious species of *Fuchsia* sect. *Encliandra* (Onagraceae). *Evolution*, **29**, 500-511.
- Bawa KS (1980) Evolution of dioecy. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**, 15-39.
- Dawes HE, Berlin DS, Lapidus DM, Nusbaum C, Davis TL, Meyer BJ (1999) Dosage compensation proteins targeted to X chromosomes by a determinant of hermaphrodite fate. *Science*, **284**, 1800-1804.
- Desplanque B (1994) Variabilité cytoplasmique chez *Phillyrea* (Oleaceae). Contribution à l'étude 1. du paradoxe de l'androdioécie chez *Phillyrea angustifolia* 2. des relations de *P. angustifolia* avec *P. latifolia* et *P. media*. DEA. Université Montpellier II.
- Despres L, Manicacci D (soumis) Is the alpine lily *Lloydia serotina* androdioecious?
- Dommée B, Geslot A, Thompson JD, Reille M, Denelle N (1999) Androdioecy in the entomophilous tree *Fraxinus ornus* (Oleaceae). *New Phytologist*, **143**, (2), in press.
- Fritsch P, Rieseberg LH (1992) High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature*, **359**, 633-636.
- Gems D, Riddle DL (1996) Longevity in *Caenorhabditis elegans* reduced by mating but not gamete production. *Nature*, **379**, (6567), 723-725.
- Hodgkin J, Barnes TM (1991) More is no better: brood size and population growth in a self-fertilizing nematode. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **246**, (1315), 19-24.
- Ishida K, Hiura T (1998) Pollen fertility and flowering phenology in an androdioecious tree, *Fraxinus lanuginosa* (Oleaceae), in Hokkaido, Japan. *International Journal of Plant Sciences*, **159**, (6), 941-947.
- Jeandroz S, Roy A, Bousquet J (1997) Phylogeny and phylogeography of the circumpolar genus *Fraxinus* (Oleaceae) based on the internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **7**, (2), 241-251.
- Knoll L (1995) Mating behaviour and time budget of an androdioecious crustacean, *Eulimnadia texana* (Crustacea: Conchostraca). *Hydrobiologia*, **298**, 73-81.

- Knoll L, Zucker N (1995a) Is sexual selection operating in the androdioecious clam shrimp, *Eulimnada texana* (Crustacea: Conchostraca)? *Hydrobiologia*, **298**, 67-72.
- Knoll L, Zucker N (1995b) Selfing versus outcrossing in the androdioecious shrimp *Eulimnadia texana* (Crustacea, Conchostraca). *Hydrobiologia*, **298**, 83-86.
- Lepart J, Dommée B (1992) Is *Phillyrea angustifolia* L. (Oleaceae) an androdioecious species ? *Botanical Journal of the Linnean Society*, **108**, 375-387.
- Leslie JF, Klein KK (1996) Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. *Genetics*, **144**, 557-567.
- Liston A, Rieseberg LH, Elias TS (1990) Functional androdioecy in the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature*, **343**, 641-642.
- Molau U (1992) On the occurrence of sexual reproduction in *Saxifraga cernua* and *S. foliosa* (Saxifragaceae). *Nordic Journal of Botany*, **12**, 197-203.
- Molau U, Prentice HC (1992) Reproductive system and population structure in three arctic *Saxifraga* species. *Journal of Ecology*, **80**, 149-161.
- Ornduff R (1972) The breakdown of trimorphic incompatibility in *Oxalis* section Corniculatae. *Evolution*, **26**, 52-65.
- Otto SP, Sassaman C, Feldman MW (1993) Evolution of sex determination in the conchostracan shrimp *Eulimnadia texana*. *The American Naturalist*, **141**, (2), 329-337.
- Pannell J (1997a) Mixed genetic and environmental sex determination in an androdioecious population of *Mercurialis annua*. *Heredity*, **78**, 50-56.
- Pannell J (1997b) Variation in sex ratios and sex allocation in androdioecious *Mercurialis annua*. *Journal of Ecology*, **85**, 57-69.
- Pannell J (1997c) Widespread functional androdioecy in *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **61**, (1), 95-116.
- Pannell JR (1995) Models of androdioecy and studies on *Mercurialis annua* L. Ph. D. diss. Oxford.
- Philbrick CT, Rieseberg LH (1994) Pollen production in the androdioecious *Datisca glomerata* (Datisceae): Implications for breeding system equilibrium. *Plant Species Biology*, **9**, 43-46.
- Platt TR, Brooks DR (1997) Evolution of the Schistosomes (Digenea: Schistosomatoidea): the origin of dioecy and colonization of the venous system. *Journal of Parasitology*, **83**, (6), 1035-1044.
- Richards AJ (1997) *Plant breeding systems*. Chapman & Hall, London, UK.
- Rieseberg LH, Hanson MA, Philbrick CT (1992) Androdioecy is derived from dioecy in Datisceae: evidence from restriction site mapping of PCR-amplified chloroplast DNA fragments. *Systematic Botany*, **17**, (2), 324-336.
- Rieseberg LH, Philbrick CT, Pack PE, Fritsch P (1993) Inbreeding depression in androdioecious populations of *Datisca glomerata* (Datisceae). *American Journal of Botany*, **80**, (7), 757-762.

- Sassaman C (1995) Sex determination and evolution of unisexuality in the Conchostraca. *Hydrobiologia*, **298**, 45-65.
- Sassaman C, Weeks SC (1993) The genetic mechanism of sex determination in the conchostracan shrimp *Eulimnadia texana*. *The American Naturalist*, **141**, (2), 314-328.
- Spencer SC, Rieseberg LH (1995) The importance of flowering time and flower number in the relative fitness of males and hermaphrodites in *Datisca glomerata* (Datisceae). *Plant Species Biology*, **10**, 65-69.
- Strasberg D (1988) Androdioécie et dynamique de populations chez *Phillyrea angustifolia* en Camargue. DEA Sciences de l'Evolution et Ecologie. USTL, EPHE, INAPG.
- Swensen SM, Luthi JN, Rieseberg LH (1998) Datisceae revisited: monophyly and the sequence of breeding system evolution. *Systematic Botany*, **23**, 157-169.
- Traveset A (1994) Reproductive biology of *Phillyrea angustifolia* L. (Oleaceae) and effect of galling-insects on its reproductive output. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **114**, 153-166.
- Valiente-Banuet A, Rojas-Martinez A, del Coro Arizmendi M, Davila P (1997) Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, central Mexico. *American Journal of Botany*, **84**, (4), 452-455.
- Weeks SC, Crosser BR, Bennett R, Gray M, Zucker N (submitted) Maintenance of androdioecy in the freshwater shrimp, *Eulimnadia texana*: estimates of inbreeding depression in two populations. *Evolution*,
- Weeks SC, Marcus V, Crosser BR (1999) Inbreeding depression in a self-compatible, androdioecious crustacean, *Eulimnadia texana*. *Evolution*, **53**, (2), 472-483.
- Wolf DE, Rieseberg LH, Spencer SC (1997) The genetic mechanism of sex determination in the androdioecious flowering plant, *Datisca glomerata* (Datisceae). *Heredity*, **78**, 190-204.
- Wood WB (1988) *The nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Zucker N, Cunningham M, Adams HP (1997) Anatomical evidence for androdioecy in the clam shrimp *Eulimnadia texana*. *Hydrobiologia*, **359**, 171-175.

Annexe 2 Protocole d'extraction d'ADN

Protocole d'extraction Edwards: méthode d'extraction d'ADN de plante pour PCR (d'après Edwards [, 1991 #850] modifié par Saumitou-Laprade [, 1999 #851])

1. Broyer 10 to 50 mg de matériel dans un tube Eppendorf avec un piston pendant 1 min à température ambiante avec 200 µl de tampon d'extraction (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS et 2% PVP-40).
2. Ajouter 200 µl de tampon d'extraction pour rincer le piston.
3. Le mélange peut être laissé à température ambiante jusqu'à l'extraction de tous les échantillons (au moins 20 min).
4. Centrifuger l'extrait à 13 000 × g pendant 4 min.
5. Transférer 300 µl de surnageant dans un nouveau tube Eppendorf.
6. Mélanger doucement avec 300 µl d'isopropanol refroidi.
7. Laisser sur la glace 5 min.
8. Centrifuger le mélange à 13 000 × g pendant 5 min à 4 °C.
9. Sécher le culot, et resuspendre dans 100 µl de TE.
10. Utiliser 1 µl d'extrait pour un mix de réaction de PCR de 25 µl PCR.

Tampon d'extraction :

Produit	[stock]	Volume stock pour 100 ml	[finale]
Tris-HCl pH 7.5	1 M	20 ml	200 mM
NaCl	5 M	5 ml	250 mM
EDTA	0.5 M	5 ml	25 mM
SDS	20%	2.5 ml	0.5%
PVP-40		2 g	2%

*Annexe 3 Primer note. Locus microsatellites chez P.
angustifolia*

Isolation of microsatellite loci for paternity testing in *Phillyrea angustifolia*
L. (Oleaceae).

Manuscrit accepté le 31/07/1999 dans *Molecular Ecology*, sous presse.



PRIMER NOTE

819.1
Au: M**Isolation of microsatellite loci for paternity testing in *Phillyrea angustifolia* L. (Oleaceae)**P. SAUMITOU-LAPRADE,* C. VASSILIADIS,*
J. T. EPPLEN† and C. HARDT‡*Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales, CNRS
UPRESA 8016, Université de Lille 1, Bâtiment SN2, F-59655 Villeneuve d'Ascq
Cedex, France, †Molekulare Humangenetik, Ruhr-Universität, D-44780
Bochum, Germany**Keywords:** microsatellite markers, Oleaceae, *Phillyrea angustifolia*

Received 4 July 1999; revision accepted 31 July 1999

Correspondence: P. Saumitou-Laprade. Fax: +33 3 20 43 69 79; E-mail:

Saumitou@univ-lille1.fr

‡Present address: Institut für Humangenetik Universitätsklinikum Essen,
D-45122 Essen, Germany.

Male and hermaphrodite individuals co-exist within the same population of *Phillyrea angustifolia* and hermaphrodites produce viable pollen (Lepart & Dommée 1992). However, effective male function of hermaphrodites in populations of *P. angustifolia* is still debated and a direct estimation of male reproductive success via paternity analysis is necessary. Microsatellite loci have been proved to be useful for paternity testing in trees (Chase *et al.* 1996). Here we report 10 primer sets designed to amplify (GA)_n and (ATT)_n microsatellites in *P. angustifolia*.

Nuclear DNA was extracted (Pillen *et al.* 1992) from one individual, digested with the restriction enzyme *AscI*, and size-fractionated on agarose gel according to Mörchen *et al.* (1996). DNA fragments ranging from 0.3 to 1.5 kb were ligated into *EcoRI*-cut dephosphorylated pUC19 cloning vector. After transformation into DH5 α competent cells (Clontech Laboratories), 13 500 recombinant clones were transferred onto nylon membranes with a Biomek 1000 robot (Beckman) and hybridized with 13 ³²P-labelled oligonucleotide probes as described by Epplen (1992).

We obtained a total of 317 positive clones: 90 were revealed by the (TC)₈ probe, 81 by (AAC)₅, 49 by (TAA)₆TA, 16 by (CA)₈, 14 by (GATA)₄, 13 by (AT)₁₂, 12 by (ACG)₅, 10 by (GGAT)₄, 9 by (GAA)₅, 8 by (CAC)₅, 8 by (CT)₄(CA)₅, 4 by (GCC)₅, and 3 by (TAC)₅. We selected 74 clones and sequenced them on a Li-Cor automated DNA sequencer 4000L, using the Sequitherm Long-Read Cycle Sequencing kit (Epicentre Technology). Eighteen clones contained repeats of at least nine di- or six trinucleotides. Primer pairs were designed using PRIMER3 (Rozen & Skaletsky 1998) with the following parameters: melting temperatures (50–60 °C), GC content (25–60%), and no. 3' GC clamps.

Total DNA was extracted from frozen leaves using a SDS-PVP method (Saumitou-Laprade *et al.* 1999). Polymerase chain

reactions (PCR) were carried out in a total volume of 15 μ L containing 10 ng of template DNA, 3.5 mM MgCl₂, 200 μ g/mL of BSA, 100 μ M dNTP, 0.2 μ M each primer (one of which was fluorescence labelled either with IRD-700 or IRD-800), 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, and 0.4 units of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer). PCR was carried out on a Perkin-Elmer Gene-Amp system 9600 (95 °C, 5 min, followed by 94 °C, 45 s, annealing temperature (Table 1), 45 s, 72 °C, 30 s, for 30 cycles, final extension 72 °C, 2 min. Amplification products, loaded on 7% denaturing polyacrylamide gels, were analysed on a Li-Cor automated DNA sequencer 4200. For each locus, the allele size was determined relative to the sequenced positive clone using a pUC19 sequence as one nucleotide size standard.

Amplification and polymorphism were tested on a sample of 16 individuals from Languedoc-Roussillon (southern France). Of the 18 primer sets tested, 10 revealed a polymorphic locus (Table 1). These 10 loci were analysed on 33–43 individuals collected in two small populations in Les Salins de Giraud (Camargue, southern France). Number of alleles and allele size range were scored, and values of H_B and H_O were determined using FSTAT software version 2.3 (Goudet 1995). Of the 10 loci presented, seven exhibited more than five alleles, and five loci showed significant differences between expected and observed heterozygosity. These differences were always due to an excess of homozygotes. In addition, we also investigated whether the primers amplify in four other Oleaceae species: *Olea europea*, *Ligustrum vulgare*, *Jasminum fruticans*, and *Fraxinus excelsior*. With the exception of one locus, amplification was successful at least in one of the tested species (Table 2).

Acknowledgements

This research was supported by a Procope research contract no. 96038. We thank Jacques Lepart for providing the plant material, Monika Mörchen for her help in establishing the genomic bank and Carole Raby for her help in optimization of the PCR conditions.

References

- Chase MR, Moller C, Kesseli R, Bawa KS (1996) Distant gene flow in tropical trees. *Nature*, **383**, 398–399.
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486.
- Lepart J, Dommée B (1992) Is *Phillyrea angustifolia* L. (Oleaceae) an androdioecious species? *Botanical Journal of the Linnean Society*, **108**, 375–387.
- Mörchen M, Cuguen J, Michaelis G, Hänni C, Saumitou-Laprade P

Epplen JT, Ed (1992) The methodology of multilocus DNA fingerprinting using radioactive or nonradioactive oligonucleotide probes specific for simple repeats motifs. *Advances in electrophoresis*, VCH, Weinheim

Table 1 Primers and characteristics of the polymorphic microsatellite loci in *Phillyrea angustifolia*. Allele size range in base pairs (bp) and number of alleles, gene diversity (H_E), observed frequency of heterozygotes (H_O), and test for Hardy-Weinberg deviation (P -values) within the two Salins populations

Accession nos	Locus	Repeat sequence	Primer sequence (5' to 3')	Annealing temp. (°C)	Size range (bp)	No. of different alleles	H_E	H_O	P -values	No. of individuals tested
AF145338	PA(GA) ₁	(AG) ₃₂	F: TTTTGAGGATCATTAGCAGCC R: AAATGGAAATGGATTCTCTCT	56	83–117	12	0.809	0.725	0.061	40
AF145339	PA(GA) ₂	(GT) ₅ (GA) ₁₇	F: AAGGAAGATGGGTCCTTTGGG R: ATTCAAGCTCCTCCACCTTCA	60	111–115	3	0.497	0.558	0.906	43
AF145340	PA(GA) ₄	(AG) ₂₅	F: CGACGGTCGTAGAATTGGA R: CAATCTACCCACGCCCTAAC	65	58–114	17	0.92	0.636	0.001	33
AF145341	PA(GA) ₅	(GA) ₁₂	F: TCTTTGCTTCGTTCGCTTTTG R: TCTTGCTCCCTCGACATTTT	56	114–156	12	0.88	0.860	0.281	43
AF 145342	PA(GA) ₆	(GT) ₁₄ (GA) ₁₃	F: AGAGAGAGTTGGAAAGGGG R: AGATTCAGATGCCGAGGATG	56	103–137	14	0.881	0.814	0.13	43
AF145343	PA(GA) ₈	(AG) ₃₀	F: TTGTAGTTGGCCATCATATACATTC R: TCACATTGAGATGATAATACGAAAGTT	55	129–178	15	0.904	0.559	0.001	34
AF145344	PA(GA) ₉	(GA) ₁₁	F: CAACACTCAACAGCCACCAC R: GGACCGTCATTATGTGAGGC	61–56*	144–166	10	0.831	0.595	0.001	42
AF145345	PA(GA) ₁₁	(GA) ₁₃	F: TTCCAAAACCTCGTTCTCTGATTC R: GGTTCACAGCAGTAGTGAGGAGC	56	106–117	5	0.466	0.561	0.991	41
AF145346	PA(ATT) ₁	(TTA) ₁₁	F: TTCACCCCGTTCAGTTTTTC R: AGAAGCCGAGTAATGAAATGTC	55	71–147	20	0.928	0.690	0.001	42
AF145347	PA(ATT) ₂	(TAA) ₆	F: CACCTCCCGTTAACAAGAA R: TGACCGGTTATTTTGTGAA	60	115–136	3	0.193	0.116	0.025	43

* Touch down.

Table 2 Cross-species amplification with the 10 pairs of *Phillyrea angustifolia* primers. An individual of each species was tested

Species	PA(GA) ₁	PA(GA) ₂	PA(GA) ₄	PA(GA) ₅	PA(GA) ₆	PA(GA) ₈	PA(GA) ₉	PA(GA) ₁₁	PA(ATT) ₁	PA(ATT) ₂
<i>Olea europea</i>	1	1	m	1	m	0	m	1	m	1
<i>Ligustrum vulgare</i>	m	1	0	1	m	0	2	1	0	0
<i>Jasminum fruticans</i>	0	0	1	2	m	0	0	2	2	0
<i>Fraxinus excelsior</i>	1	2	1	2	1	0	1	2	1	1

0, 1, 2: no, one, or two PCR products detected; m/multiple banding pattern.

(1996) Abundance and length polymorphism of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 326–333.

Pillen K, Steinrücken G, Wricke G, Herrmann RG, Jung C (1992) A linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theoretical and Applied Genetics*, 84, 129–135.

Rozen S, Skaletsky HJ (1998) Primer 3. Code available at http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html

Saunier-Laprade P, Piquot Y, Raspé O, Bernard J, Vrieling K (1999) Plant DNA fingerprinting and profiling. In: *DNA Profiling and DNA Fingerprinting* (eds Epplen JT, Lubjuhn T), pp. 17–38. Birkhäuser Verlag, Berlin.

4

5

Postface

"Grau, treuer Freund, ist alle Theorie,
Und grün des Lebens goldner Baum"¹

Goethe, Faust, erster Teil (1790).

Il s'agissait dans cette thèse non de l'arbre d'or de la vie, qui d'ailleurs ne se laisserait nullement enfermer dans une quelconque théorie, mais simplement d'un arbuste méditerranéen dont l'étrange système de reproduction en fait fleurir de nouvelles...(et Goethe ne connaissait pas encore les si jolies courbes de Mathematica).

¹ "Grise, cher ami, est toute théorie / Et, vert l'arbre d'or de la vie" (Trad. Henri Lichtenberger); ou bien "Toute théorie est rèche, / Seul l'arbre de la vie est fleuri" (Trad. Gérard de Nerval).