

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

École Doctorale Sciences et Environnements  
Spécialité Écologie évolutive, fonctionnelle et des communautés

Par Clément LARUE

**De la pollinisation à la formation des graines :  
le cas du châtaignier**

Sous la direction de : Rémy PETIT

Soutenue le 8 décembre 2021

Membres du jury :

Mme Sylvie ODDOU-MURATORIO	DR INRAE	Rapporteuse
M. André PORNON	MCF Univ Toulouse III	Rapporteur
Mme Emmanuelle PORCHER	Professeure MNHN	Examinaterice
M. Bertrand SCHATZ	DR CNRS	Examinateur

**Unité de recherche**

Univ. Bordeaux, INRAE, BIOGECO, UMR1202, 33610 Cestas, France

## **De la pollinisation à la formation des graines : le cas du châtaignier**

**Résumé :** La reproduction sexuée des plantes est une étape clé de leur cycle de vie, dont dépend le fonctionnement des écosystèmes et notre l'alimentation. Pour les plantes à graines, la reproduction sexuée implique le succès préalable de la pollinisation, c'est-à-dire le transport du pollen des étamines vers les stigmates. Mais celle-ci peut échouer car la quantité de pollen compatible produite peut être limitante, ou bien le ou les vecteurs du pollen peuvent être inefficaces, aboutissant dans les deux cas à une quantité et une qualité de pollen reçu insuffisantes. Enfin, une fois le pollen déposé sur les stigmates, des mécanismes post-pollinisation peuvent aboutir à l'avortement de l'ovule ou de la graine avant sa maturité. Le châtaignier européen (*Castanea sativa*, Fagacées), un arbre forestier et fruitier important, est utilisé dans cette thèse comme espèce modèle pour comprendre et modéliser les principales étapes de la pollinisation et de la formation des graines. A l'aide d'observations (phénologie, architecture florale, insectes visiteurs), d'expériences (exclusion d'insectes avec des filets et émasculation), d'analyses moléculaires (caractérisation de la diversité génétique à l'aide de marqueurs SNP et de microsatellites nucléaires et chloroplastiques, recherches de paternité), et d'un modèle bayésien spatialement explicite, les mécanismes du succès de la pollinisation du châtaignier et de la formation des fruits sont étudiés en détail, afin d'identifier les mécanismes clés de la reproduction en verger ou en forêt. En empêchant les insectes d'accéder aux fleurs femelles à l'aide de filets anti-insectes, la production de fruits s'effondre, prouvant ainsi que la pollinisation des châtaigniers est assurée par les insectes et non par le vent. Les coléoptères et les diptères sont les principaux insectes pollinisateurs, à la différence des abeilles, qui ne visitent pas les fleurs femelles. Certains châtaigniers sont mâle-stériles, c'est-à-dire qu'ils ne produisent plus de pollen. Cette stérilité mâle est d'origine cytoplasmique et existe à l'état naturel chez le châtaignier européen, qui est donc une espèce gynodioïque. Les arbres mâle-stériles produisent nettement plus de fruits que les arbres mâle-fertiles. Une expérience d'émasculation a mis en évidence le fort impact négatif de l'autopollinisation sur le succès de la pollinisation, suggérant que l'un des principaux mécanismes à l'origine de l'avantage des femelles et du maintien de la gynodioecie chez le châtaignier est l'interférence entre les fonctions maternelles et paternelles aboutissant au gaspillage d'ovules chez les individus bisexués. Ce mécanisme a été confirmé par modélisation : les recherches de paternité et les mesures du succès de la pollinisation sont bien expliquées par un mécanisme d'auto-interférence provoquant l'avortement des graines auto-pollinisées. Le modèle a aussi permis de mettre en évidence des barrières spécifiques variables et asymétriques entre les différentes espèces de châtaignier étudiées qui expliquent bien les résultats obtenus en vergers de production. Pour finir, les difficultés rencontrées lors du transfert de ces résultats au grand public et aux professionnels sont brièvement discutées.

*Mots-clés* : pollinisation, recherche de paternité, SNP, SSR, modèle spatialement explicite, auto-incompatibilité, stérilité mâle, gynodioécie, avantage à être femelle, Fagacées, Châtaignier, services écosystémiques

## From pollination to seed production: the case of chestnut

*Abstract:* Sexual reproduction of plants is a key stage in their life cycle, on which the functioning of ecosystems and our food supply depend. For seed plants, sexual reproduction requires successful pollination, i.e. the transport of pollen from the stamens of a flower to the stigmas. This can fail if the quantity of compatible pollen produced is insufficient (pollenizer limitation) or if pollen is not transported successfully (pollinator limitation), both mechanisms resulting in an insufficient quantity or quality of pollen received by the stigmas (pollen limitation). Once the pollen has been delivered, post-pollination mechanisms can result in ovule or seed abortion before maturity. The European chestnut (*Castanea sativa*, Fagaceae), an important forest and fruit tree, is used to explore and model pollination and seed set. Using observations (phenology, floral architecture, insects), experiments (insect exclusion with insect-proof nets and emasculation), molecular analyses (characterization of genetic diversity using SNP markers and nuclear and chloroplast microsatellites, and paternity analyses), and the first spatially explicit Bayesian model encompassing pollination and fruit set, a detailed account of chestnut pollination is provided. The objective is to identify the key reproductive mechanisms that allow fruit formation in orchards and forests. By preventing insects from accessing to female flowers with insect-proof nets, fruit production collapses, thus proving that chestnut trees are insect-, not wind-pollinated, as was assumed before. Beetles and flies, not bees, are the main pollinators. Some European chestnuts are naturally male-sterile, i.e. they no longer produce pollen, indicating that this species is gynodioecious. Male sterility is of cytoplasmic origin, with male-sterile trees producing more fruits than male-fertile ones. An emasculation experiment demonstrates the strong negative impact of self-pollination on fruit set, suggesting that one of the main mechanisms behind this sexual polymorphism is self-interference between maternal and paternal functions resulting in ovule discounting in cosexual trees. This mechanism was confirmed by modelling: male fecundity and female mating success are well explained by a self-interference mechanism causing abortion of selfed seeds. The model also revealed variable and asymmetrical barriers between chestnut species, matching well with observed paternity and seed set in production orchards. Finally, difficulties encountered in transferring these results to the public and to farmers are briefly discussed and possible solutions are outlined.

*Keywords:* pollination, paternity analyses, SNP, SSR, spatially-explicit model, self-incompatibility, male-sterility, gynodioecy, female advantage, Fagaceae, Chestnut, ecosystem services



# Remerciements

Voici le moment le plus difficile et plus redouté d'une thèse, la rédaction des remerciements. Il est difficile de n'oublier personne et de ne pas frustrer les oublié.e.s quand cela arrive... Bon, je me lance !

Merci à toi **Rémy**, pour ton encadrement de thèse irréprochable. Après un stage de Master génial, j'ai pu faire une thèse extraordinaire. Je devrais te remercier pour plein de choses : de m'avoir transmis ta passion pour la science, ta patience, ta rigueur notamment...

Cela est aussi valable pour toi, **Alexis** ! Quel plaisir de te côtoyer tous les jours à Pierroton, enfin avant la Covid, car maintenant, je ne te vois plus trop. Merci de m'avoir transmis ta passion naturaliste, fait rêver avec tous les lieux magnifiques que tu as visités et toutes les folles aventures qui te sont arrivées. Comment ne pas être passionné par l'écologie quand on partage ton bureau ?

Tout cela est (trop) classique. Alors je vais utiliser un peu d'ironie : je ne vous remercie pas tous les deux pour m'avoir fait découvrir la photo naturaliste et de me faire ainsi dépenser tout l'argent que je gagne pendant ma thèse dans du matos photo. Merci de m'avoir fait découvrir la frustration et l'insatisfaction car l'animal photographié n'est jamais sous le bon angle, la lumière n'est jamais assez belle et le cliché jamais assez sharp. Grâce à vous, je vois le monde d'un nouvel œil (de photographe), et je dis des choses comme la lumière est « trop aggressive » ou « quel magnifique bokeh » (du japonais « boke », désigne l'arrière-plan flou d'une photographie ; cf. le rouge-gorge qui venait me rendre visite pendant la rédaction de ce manuscrit).

J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi, **Teresa**, c'est même dommage que ce ne soit pas arrivé plus souvent. Pour ton caractère bien trempé, pour m'avoir conté l'Histoire du châtaignier et fait découvrir le Pays Basque (avec des majuscules aux deux mots hein), je te dis « *Eskerrik asko* ».

Merci à toi aussi **Etienne**, pour m'avoir conseillé tout au long de ma thèse, pour la découverte des statistiques bayésienne et pour avoir construit un si beau modèle. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi et j'espère que je reviendrai rapidement en formation à Avignon.

Je remercie mes collègues d'**Invenio**, **Sébastien**, mon responsable scientifique, merci de m'avoir fait vivre l'aventure Invenio et présenté le monde de l'expérimentation sur les

fruits et légumes. Je remercie particulièrement mes collègues de l'ancien pôle « châtaigne », **Nathalie** et **Mathieu**, qui m'ont initié à la castanéiculture, **Angèle**, l'animatrice de la nouvelle équipe arboriculture (P.S. : désolé pour toutes les réunions où je suis arrivé en retard) et tous les techniciens et saisonniers qui m'ont aidé à couper des fleurs, ramasser des bogues et compter des fruits. Merci de ne pas m'avoir pris pour un fou lorsque je vous ai dit qu'on allait émasculer des châtaigniers en coupant toutes les fleurs mâles de nombreux arbres.

Note pour moi-même : ne pas jouer à « cap ou pas cap » avec son directeur de thèse, notamment quand il te met au défi de faire une expérience où il faut retirer les fleurs mâles de nombreux arbres... Car finalement, cela prend du temps de couper plus de 10 000 fleurs réparties sur 45 arbres différents.

Une mention particulière pour mes deux acolytes, **Marie** et **Céline**, qui m'ont soutenu tous les jours de ma thèse : merci pour votre bonne humeur, votre patience et vos précieux conseils, même si vous râlez beaucoup et que vous mangez tout mon chocolat, je vous aime bien.

Je remercie aussi les membres de mon équipe Ecogère notamment **Olivier L.**, gourou des logiciels de génétiques des populations, dont l'interface n'est pas forcément ergonomique : merci de m'avoir fait découvrir le génotypage par séquençage, c'est vraiment une technique de ouf ! Merci à toi **Catherine** pour ton talent pour organiser les missions sur le terrain, et merci à toi **Bérengère**, pour ton expérience en entomologie.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement **Virgil** et **Marie-Lise** pour la qualité de vos enseignements : les précieux conseils en statistiques et en SIG que vous m'avez prodigués pendant mon parcours universitaire m'ont souvent aidé pendant cette thèse.

Cette profusion de résultats n'aurait pas pu être possible sans le **PCM OEL** (Pôle Compétence Métier Observation - Expérimentation - Laboratoire) et la **PGTB** (Plateforme Génomique et Transcriptomique de Bordeaux). Sans les technicien.ne.s de Biogeco, je n'aurais pas eu autant de mesures de terrain : merci à vous **Alice**, **Céline**, **Chantal**, **Martine**, **Benjamin**, **Olivier B.**, **Yannick**, et **Xavier**. Et sans la plateforme, je n'aurai pas eu tous ces génotypes : merci à vous **Erwan**, **Marie**, **Adline**, **Christophe**, **Emilie**, **Laure** et **Charlotte**. Désolé d'avoir été si pointilleux avec Rémy et de vous avoir fait refaire les choses plusieurs fois... (On a passé du temps à obtenir les deux multiplex de SNP pour les analyses de paternité, tu ne diras pas le contraire Erwan ?)

Je remercie la CASTA TEAM : Benoît, pour son travail castanea-centré et son initiation à la bioinfo, ainsi que nos collègues espagnols Josefa et Javier pour avoir partagé leurs nombreuses connaissances sur le châtaignier.

J'ai eu la chance de co-encadrer avec Rémy plusieurs stagiaires : Gaëlle (M1) et Grégoire (M1) fans des petites bêtes ; Tanguy (L3), Julien (L3) et Marie (L2) à qui j'ai fait compter plein de trucs horribles allant du nombre de grains de pollen par étamine au nombre de fleurs mâles par arbre ; Eva (dernière année d'école d'ingénieur) et Sarah (M2), qui m'ont aidé à faire les premières analyses statistiques ou génétiques sur des sujets importants de ma thèse. Grâce à vous, nous avons acquis de précieux résultats, qui viennent enrichir ma thèse. Je vous souhaite de tout cœur de la réussite pour vos projets personnels et professionnels. J'espère que je n'ai pas été trop naze comme encadrant (difficile face à Rémy !) et peut-être que vous aussi vous aurez un jour des padawans (cf. Star Wars, et les apprentis Jedi).

Je remercie mes collègues CDD/Doctorants pour les bons moments partagés et tout particulièrement Marine, Coralie, Domitille et Geoffrey. Dédicace particulière à mon pote Jason qui fait de l'informatique théorique, ou un truc du genre (je n'ai toujours pas compris), et qui me code des petits logiciels pour résoudre les problèmes d'analyses de données que je rencontre. Je remercie mes plus fidèles amis, pour leur soutien infaillible, ceux du Périgord : Anaïs, Emeline, Guillaume et Mathieu mais aussi ceux rencontrés pendant mon aventure Bordelaise : Agathe et Pierre. Merci à mes collègues tireurs et bricoleurs, qui m'ont permis de me changer les idées : pendant une compétition sur les pas de tirs, ou dans un atelier au fond d'une grange. Grâce à vous j'ai pu relativiser et créer de nouvelles inventions (même si ce ne sont pas toutes des réussites).

Je remercie toutes les personnes qui ont rendu cette thèse possible. L'idée à l'origine de celle-ci est le fruit de la rencontre entre Pierre, le directeur d'Invenio à l'époque, et Cécile et Teresa, qui ont de suite identifié Rémy comme le directeur de thèse idéal. Merci Pierre d'avoir voulu recruter un doctorant avec le programme Cifre et Christophe, de m'avoir accueilli dans l'UMR Biogeco. Merci de m'avoir donné la possibilité de faire une thèse et j'espère que vous n'êtes pas déçus des résultats ! Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse Bernard, Inge, Cécile, Teresa, Etienne, Sébastien pour vos avis et précieux conseils qui ont facilité le bon déroulement de cette thèse. Je remercie mes relecteurs pour l'aide que vous m'avez apporté pour la rédaction de ce manuscrit, et les membres de mon Jury : Sylvie Oddou-Muratorio, André Pournon, Emmanuelle Porcher et Bertrand Schatz d'avoir accepté de l'évaluer en si peu de temps.

J'ai bien changé depuis l'époque où une fois rentré de l'école primaire, je faisais « 4h » en regardant « C'est pas sorcier » avec Jamy Gourmaud. Le temps passe, mais la passion reste... Je remercie les professeurs de Sciences de la Vie et de la Terre que j'ai eus au collège et au lycée : Cyril Pagès, Laura Peruchaud et Erwan Sellin, merci de m'avoir fait découvrir cette discipline fascinante. Je remercie aussi chaleureusement mes deux premières maitresses de stage Monique Burrus et Nathalie Escavarage de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et la biologie moléculaire.

Je dédie ce travail à ma famille : plus particulièrement à mes parents, Roselyne et Dominique, et à mes grands-parents, Denise et Paul.

Encore une fois, je remercie chaleureusement tous ceux qui ont rendu cette expérience si agréable. Et comme on dirait chez moi : *Au legissaire una bona letura, a votre tos adissias e a gaire de tems per vos reveire.*

A handwritten signature in blue ink that reads "Clement". The signature is fluid and cursive, with a large, sweeping loop on the left side.

# Table des matières

Introduction Générale .....	13
Chapitre 1 - Une boîte à outils pour l'étude de la pollinisation .....	37
Préambule.....	41
Efficient monitoring of phenology in chestnuts .....	45
Development of highly validated SNP markers for genetic analyses of chestnut species.....	57
An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction .....	63
Chapitre 2 - La pollinisation du châtaignier par les insectes .....	69
Préambule.....	73
Revisiting pollination mode in chestnut ( <i>Castanea spp.</i> ): an integrated approach.....	75
Le rôle crucial des insectes dans la pollinisation du châtaignier est confirmé.....	105
Evaluation du rôle des téléphores faunes mâles et femelles dans la pollinisation du châtaignier .....	111
Quels sont les principaux pollinisateurs du châtaignier ? .....	123
Chapitre 3 - Stérilité mâle et succès de la pollinisation .....	133
Préambule.....	137
Mise en évidence d'une stérilité mâle cytoplasmique chez le châtaignier européen.....	139
Comment mesurer le succès de la pollinisation du châtaignier ? .....	153
Le taux de remplissage des bogues dépend-il des ressources ? .....	165
Self-interference and female advantage in chestnut .....	171
Chapitre 4 - Système d'appariement et succès de la pollinisation en verger.....	183
Préambule.....	187
Le trop faible nombre de donneurs de pollen limite la production dans les vergers.....	189
Coupling pollen pool and fruit set models reveals sexual interference in chestnut .....	209

Chapitre 5 - La pollinisation expliquée : transfert et communication .....	245
Préambule.....	249
Ce que la vie amoureuse du châtaignier nous enseigne de l'agroécologie .....	255
Diversifier pour mieux polliniser .....	259
Vers une meilleure pollinisation du châtaignier.....	263
Discussion Générale .....	265
Annexes .....	283
Supplementary 1: High throughput cost-effective CTAB DNA isolation protocol for nuts and leaves of chestnut trees.....	285
Supplementary 2: MISMATCHFINDER, what is it? and how does it work?.....	288
Supplementary 3: STRUCTURE parameters.....	290
Supplementary 4: Probability of identity and probability of exclusion for chestnut species based on 68 SNPs versus 94 SSRs.....	291
Supplementary 5 : Fréquences alléliques des SSR chloroplastiques par espèce et identification des allèles fixés.....	292

# Introduction Générale

---

Cette thèse Cifre (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche), gérée et subventionnée par l'ANRT (l'Association Nationale de la Recherche de la Technologie, convention Cifre N° 2018/0179), a été cofinancée par Invenio, la Région Nouvelle-Aquitaine (projet Regina N° 22001415-00004759 et projet pollinisation châtaignier N° 22001216-00002632), et INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement). Elle a débuté en Mai 2018. Elle s'intègre aux recherches menées par le pôle arboriculture d'Invenio, coordonné par Sébastien Cavaignac, qui visent à améliorer la production de fruits des vergers. Les expérimentations se sont déroulées dans les vergers expérimentaux d'Invenio à Douville (Dordogne) et dans la collection INRAE de ressources génétiques du châtaignier de la Grande Ferrade à Villenave d'Ornon (Gironde). Les travaux présentés ici ont été réalisé au sein de l'UMR Biogeco, dans l'équipe Ecogère, sous la direction de Rémy Petit. Toutes les analyses génétiques ont été réalisées à la Plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux (PGTB). Les résultats de ces travaux sont présentés sous la forme d'une thèse sur articles. Après une introduction générale, cinq chapitres sous forme d'articles ou projets d'articles en anglais complétés par des résultats plus récents rédigés en français sont présentés, suivis d'une discussion générale et d'une conclusion.

---

*La plupart des photographies présentées dans cette thèse, notamment celles utilisées à chaque début de chapitre, sont de Rémy Petit.*

---

## LES ENJEUX DE L'ETUDE DE LA POLLINISATION

La pollinisation correspond, chez les plantes à graines (gymnospermes et angiospermes), à l'émission du pollen depuis les anthères d'une plante, à son transport puis à son dépôt sur les stigmates d'une plante compatible. Elle précède donc la fécondation des ovules et la production des graines. C'est néanmoins une étape clé de la reproduction des plantes, celle où le gamétophyte mâle (le pollen) est dispersé, permettant d'assurer la fécondation entre individus d'une même espèce plus ou moins éloignés les uns des autres et voués à l'immobilité. La majorité des plantes à fleurs sont pollinisées par des animaux, environ 87,5 % sur les ~352 000 espèces d'angiospermes (Ollerton 2021). Sans ces polliniseurs, de très nombreuses plantes ne produiraient plus du tout de graines ou seraient bien moins fécondes. Cela est particulièrement vrai dans le cas des arbres et des espèces de plantes tropicales (Rodger et al. 2021). Ce service de pollinisation est donc un service écosystémique essentiel pour la durabilité des écosystèmes et pour l'alimentation humaine.

Depuis la fin des années 90, nous savons que les activités humaines menacent de plus en plus ce service de pollinisation (Allen-Wardell et al. 1998 ; Kearns et al. 1998 ; Potts et al. 2010a) : le changement d'utilisation des sols, l'agriculture intensive avec l'utilisation massive de produits phytosanitaires, la fragmentation des habitats, l'introduction d'animaux, de plantes et de maladies exotiques, ainsi que le changement climatique, impactent négativement ce précieux service écosystémique. Les preuves concernant le déclin des insectes en général (Hallmann et al. 2017) et des polliniseurs en particulier (Dicks et al. 2021), et leur impact négatif sur la reproduction des plantes entomophiles, s'accumulent (Biesmeijer et al. 2006 ; Potts et al. 2010a). Même les abeilles domestiques entretenues par les apiculteurs ne sont pas épargnées (Potts et al. 2010b). Dans ce contexte, les recherches sur les interactions plantes – polliniseurs et sur leurs conséquences pour la formation des graines sont nécessaires pour évaluer les risques associés et proposer des solutions.

### Etudier conjointement pollinisation et système d'appariement

La reproduction des plantes est un processus complexe. La pollinisation comprend différentes étapes : émission, transport et réception du pollen. Une fois le pollen déposé sur le stigmate, la pollinisation est terminée, mais la reproduction n'est pas encore assurée. Différentes étapes interviennent, à tel point que la composition du mélange de pollen déposé sur les stigmates peut différer grandement de celui qui fécondera les ovules ou sera à l'origine des graines. On distingue les étapes précédant la fécondation (phase prézygotique) et la suivant (phase postzygotique). Lors des étapes prézygotiques, le pollen germe, le tube pollinique croît jusqu'à l'ovule, y pénètre, assurant la double fécondation. Les étapes postzygotiques correspondent au développement de l'embryon pour donner une graine mature et au développement de tissus associés (ovaires se transformant en fruits). Les mécanismes post-pollinisation

peuvent modifier les résultats de la pollinisation, mais la reproduction reste néanmoins tributaire du pollen reçu au départ (Harder et Barrett 1996). Dans cette thèse, je me suis intéressé à toutes ces étapes : j'aborde donc non seulement la pollinisation, mais aussi le système d'appariement (aboutissant à la fécondation de l'ovule) et les premières phases du développement du zygote. En effet, bien que la dispersion du pollen dépende des interactions plantes-polliniseurs, le système d'appariement des plantes et le développement de la graine circonscrivent aussi fortement la reproduction des plantes.

De l'avis de plusieurs auteurs, l'écologie de la pollinisation et les systèmes d'appariement sont trop peu fréquemment étudiés conjointement (ex. Harder et Barrett 1996 ; Devaux et al. 2014). D'une part, les écologues de la pollinisation étudient l'effet des syndromes floraux sur l'attractivité des insectes, l'exportation du pollen, et la limitation par le pollen de la reproduction des plantes, sans pouvoir déterminer quelles plantes ont fourni le pollen. D'autre part, les biologistes qui étudient les systèmes d'appariement des plantes modélisent les échanges de pollen, l'autofécondation, les barrières interspécifiques mais, en n'analysant que les graines produites, se désintéressent des échecs de la pollinisation (Harder et Barrett 1996). L'objectif de cette thèse est de combiner les approches naturalistes et écologiques de l'étude de la pollinisation aux approches génétiques de l'étude du système d'appariement. En effet, ces approches sont complémentaires : seule leur association permettra de comprendre tous les déterminants du succès ultime de la pollinisation.

La probabilité de fécondation des ovules, ou succès d'appariement femelle, se mesure sous forme d'une proportion, et non d'une quantité : généralement la proportion de fleurs produisant des graines, ou une mesure approchante. Il est en effet difficile d'étudier directement la proportion d'ovules fécondés. De plus, le nombre d'ovules par fleur est généralement plus élevé que le nombre final de graines (Burd 1995). Le taux de graines produites dépend donc non seulement du succès de la pollinisation (le dépôt effectif et en temps voulu de pollen sur les stigmates) mais aussi du succès de la fécondation et du succès du développement de la graine (voire du fruit entourant les graines).

Ce succès d'appariement femelle (obenu en estimant le taux de graines formées) doit être distingué de la fécondité femelle (le nombre de graines produites). La fécondité femelle correspond au rendement, dans un contexte de production agricole, et à la *fitness* femelle, dans le cadre de l'étude de l'évolution. Elle dépend non seulement du succès de l'appariement mais aussi d'autres facteurs, comme le nombre total de fleurs produites par individu. Toutefois, pour ce travail sur la pollinisation et ses conséquences, c'est bien une mesure de la proportion de graines pleines, plutôt qu'une mesure du nombre de graines produites, qui doit être employée.

## L'étude des systèmes d'appariement des plantes

Les premières études pour reconstituer les échanges de pollen entre plantes grâce à des pièges à pollen ou à des suivis de pollen coloré s'étant révélées imprécises, ce sont les marqueurs génétiques qui fournirent la solution (Ashley 2010). Cela marqua le début des travaux sur le système d'appariement informés par les analyses de paternité, ancrant ces travaux dans le domaine de la génétique mendélienne et des populations. Ces analyses permettent en effet d'identifier les pères de graines caractérisées génétiquement et de déduire les distances séparant les pères et les mères. Pour mieux interpréter ces données, des modèles d'appariement spatialement explicites ont ensuite été développés. Ils permettent d'estimer la fécondité mâle des plantes en tenant compte de leur distribution spatiale et d'ajuster un noyau de dispersion du pollen. Ces modèles permettent aussi de modéliser les facteurs intrinsèques et extrinsèques qui influencent la fécondité mâle et la compatibilités entre plantes (Oddou-Muratorio et al. 2005 ; Klein et al. 2008 ; Lagache et al. 2013, 2014). Toutefois, ils sont basés uniquement sur l'analyse de graines existantes. En conséquence, les mécanismes qui modulent le succès final de la pollinisation, comme l'attraction des insectes chargés de pollen vers les stigmates des fleurs, ou la mortalité précoce des graines, ne sont pas pris en compte, aboutissant à une vision incomplète de la pollinisation.

## L'écologie de la pollinisation

En écologie de la pollinisation, les recherches pour déterminer si le pollen apporté par les insectes est en quantité suffisante pour correctement polliniser les plantes sont basées sur la mesure de la proportion de fleurs qui se développent en graines ou en fruits, parfois complétée par un traitement où on ajoute du pollen aux fleurs pour tester si le pollen est réellement limitant (Stephenson 1981 ; Burd 1994 ; Larson et Barrett 2000 ; Bennett et al. 2020). Mais sans marqueurs moléculaires, on ne peut pas faire le lien entre la composition du nuage pollinique auquel la plante mère est exposée et ce succès d'appariement femelle. Du coup, cela revient à essayer de comprendre les échecs de la pollinisation sans information précise sur la quantité et la qualité du pollen qui arrive sur la plante mère étudiée.

L'enjeu est donc d'arriver à intégrer l'étude du système d'appariement et l'écologie de la pollinisation. Pour faciliter l'intégration nécessaire et introduire les notions de base utilisées dans cette thèse, je résume ici à grands traits les principales caractéristiques de la pollinisation et du système d'appariement des angiospermes, en me focalisant sur les espèces pollinisées par les insectes. Il existe de nombreux ouvrages sur l'écologie de la pollinisation et la reproduction des plantes à fleurs (Doust et Doust 1988 ; Harder et al. 2006 ; Willmer 2011 ; Shivanna et Tandon 2014 ; Ollerton 2021). L'idée ici est juste d'introduire les principales notions utilisées dans cette thèse. Il y a dans la littérature botanique une profusion de termes pour décrire tous les types de stratégie reproductives des plantes (allogamie, dichogamie, herkogamie,

geitonogamie, entomophilie, anémophilie, etc.). J'en ferai une utilisation parcimonieuse, en insistant plutôt sur la variation continue observée dans la nature et sur les mécanismes sous-jacents.

## Organisation florale

Les angiospermes possèdent une organisation de leurs organes sexuels très diversifiée, souvent complexe, liée à leur architecture modulaire. Les fleurs élémentaires peuvent être unisexuées (mâle ou femelle) ou bisexuées. Ces fleurs peuvent être rassemblées en inflorescences formées d'un seul type de fleur ou de plusieurs types de fleurs. Sur chaque individu, on peut trouver un ou plusieurs types de fleurs ou d'inflorescences. On distingue en particulier si les individus sont unisexués ou bisexués. A l'échelle de la population, les individus peuvent être tous identiques (nécessairement bisexués) ou alors il peut exister un polymorphisme, avec deux types d'individus différents, voire plus, qui coexistent dans les populations. Par exemple, une espèce gynodioïque comprend des individus femelles et des individus bisexués.

## Autopollinisation, autofécondation et autointerférence

Chez les plantes bisexuées, l'autopollinisation peut se produire. Elle rend l'autofécondation possible, mais pas automatique, des barrières internes pouvant empêcher l'auto-pollen de féconder les ovules. Le pollen peut être transféré au sein d'une même fleur des étamines vers les stigmates, dans le cas de fleurs bisexuées ; ou le pollen émis par les étamines d'une fleur peut polliniser les stigmates puis féconder les ovules d'autres fleurs portées par ce même individu. Dans ce dernier cas, l'intervention d'un vecteur animal peut être nécessaire pour qu'il y ait autopollinisation.

Chez les plantes bisexuées, on trouve de nombreux mécanismes favorisant la pollinisation croisée, comme noté déjà par Darwin (1877). Les fleurs mâles et femelles peuvent être séparées spatialement. Les périodes d'émission du pollen et de réceptivité des fleurs femelles d'une même plante peuvent aussi être séparées dans le temps, c'est la dichogamie, avec une séquence où les fleurs mâles précèdent les fleurs femelles, ou *vice versa*. Enfin, les plantes peuvent être auto-incompatibles, avec des mécanismes de rejet du pollen venant de la même plante. Le fait que certaines plantes allogames combinent plusieurs de ces mécanismes, là où un seul suffirait pour assurer la pollinisation croisée, indique qu'il existe une pression de sélection non seulement pour éviter l'autofécondation mais aussi pour minimiser l'interférence entre les fonctions mâle et femelle d'un individu (Lloyd et Webb 1986 ; Webb et Lloyd 1986 ; Barrett 2002b). En particulier, l'autopollinisation, même si elle n'aboutit pas à l'autofécondation, peut avoir un effet délétère sur la plante en provoquant notamment un gaspillage des gamétophytes mâles et femelles (de Jong et al. 1993 ; Barrett 2002a).

## La pollinisation chez les espèces entomophiles

Pour attirer les polliniseurs, les plantes ont mis en place une grande diversité de stratégies (Delpino 1874 ; Ollerton 2008). Un syndrome de pollinisation correspond à un ensemble de traits floraux semblables qui ont évolué par convergence en réponse à la pression de sélection imposée par les vecteurs du pollen. Dans le cas de plantes entomophiles, la liste des traits impliqués est longue : le nombre, la taille, la forme et la couleur des fleurs (Stanton et al. 1986 ; Bauer et al. 2017), mais aussi leur odeur (Ayasse 2006 ; Vereecken et al. 2010), ou encore le type de récompenses et la qualité du nectar sécrété (Real et Rathcke 1991). Les fleurs peuvent aussi assurer leur pollinisation en servant de refuge, parfois climatisé, de lieu de rendez-vous ou de piste d'atterrissage pour les polliniseurs.

Les plantes entomophiles doivent attirer les polliniseurs pour expédier leur pollen vers d'autres fleurs, assurant ainsi leur succès reproducteur mâle, et pour recevoir le pollen transporté par ces polliniseurs, assurant ainsi leur succès reproducteur femelle. Ce ne sont pas nécessairement les mêmes mécanismes qui sont en jeu pour l'export et pour l'import du pollen (Harder et Routley 2006). Souvent, le nombre optimum de visites de polliniseurs pour assurer l'exportation du pollen est plus élevé que le nombre de visites nécessaire pour assurer une bonne pollinisation (Bell et Hamilton 1985).

## Reconnaitre les « bons » polliniseurs

Il existe tout un gradient de polliniseurs des plus généralistes aux plus spécialisés (Darwin 1862). Même les individus mâle et femelle d'une même espèce d'insecte peuvent avoir des comportements différents, et donc différer en termes d'efficacité de pollinisation (Smith et al. 2019). Cette différence entre sexes du service de pollinisation est parfois plus marquée que celle entre différentes espèces d'insectes.

Toutes les interactions entre insectes et fleurs ne sont pas bénéfiques : on distingue ainsi les polliniseurs « légitimes », qui forment des mutualismes avec les plantes, des simples visiteurs et des antagonistes qui prélèvent des ressources florales ou interfèrent avec des polliniseurs plus efficaces au point de diminuer le succès de pollinisation de la plante (Maloof et Inouye 2000 ; Rodríguez-Rodríguez et al. 2017). Dans l'autre sens, les plantes peuvent exploiter les polliniseurs pour assurer leur pollinisation, sans leur fournir de récompense en échange, en les trompant par leur odeur ou leur apparence (Schaefer et Ruxton 2009).

Pour savoir si un insecte est un pollinisateur potentiel, il faut étudier son comportement. L'insecte candidat doit visiter les fleurs au moment où elles produisent du pollen, s'y charger en pollen, et déposer ce pollen sur des fleurs réceptives. Ces observations sont facilitées quand les plantes ont des fleurs unisexuées, permettant de vérifier qu'un insecte joue bien un rôle à la fois dans l'exportation et l'importation du pollen. La qualité du pollen que le pollinisateur transporte et dépose est également important à considérer. En particulier, le pollen apporté par l'insecte doit être de la même espèce que la

plante visitée. De plus, si la plante est auto-incompatible, il faut que le pollen apporté provienne d'autres plantes de la même espèce, un point clé mais difficile à prouver. Les syndromes floraux résultent de l'adaptation permanente des plantes à leurs pollinisateur, pour les attirer afin d'augmenter leur fécondité, tout en minimisant l'impact des insectes exploitant les plantes sans fournir de service de pollinisation.

## Les obstacles à une bonne pollinisation

La pollinisation peut échouer pour de nombreuses raisons (Wilcock et Neiland 2002 ; Harder et Aizen 2010 ; tableau 1). Les mécanismes correspondants sont liés à la plante ou à son environnement (Barrett et Harder 2017). Lorsque qu'une plante produit peu de graines, une première hypothèse est que celle-ci ne reçoit pas assez de pollen, soit parce qu'il n'y a pas assez de partenaires de la même espèce disponibles (*pollenizer limitation*) soit parce qu'il n'y a pas assez d'insectes pollinisateur pour transporter le pollen (*pollinators limitation* ; Figure 1). Au total, le succès de la pollinisation est limité par la quantité de pollen reçu (*pollen limitation*). Mais les problèmes peuvent aussi se manifester après la pollinisation *sensu stricto*, quand la qualité du pollen reçu n'est pas suffisante. Cela peut intervenir avant la fécondation de l'ovule : ce sont les mécanismes prézygotiques, par exemple à cause de barrières interspécifiques (Lagache et al. 2013 ; Klein et al. 2017), de mécanismes d'auto-incompatibilité, ou quand l'auto-pollen gêne le dépôt de pollen compatible (« *pollen clogging* »). Enfin ces échecs peuvent avoir lieu après la formation du zygote, à cause de mécanismes postzygotiques, comme dans le cas d'une consanguinité exprimée précocement, et provoquant la mort de l'embryon autofécondé. Les incompatibilités tardives mère-descendant (*late-acting self-incompatibility*) peuvent être pré- ou postzygotiques (Xiong et al. 2019). Les tubes polliniques atteignent bien les ovules mais aucun embryon n'est produit. Tous ces obstacles successifs doivent être surmontés pour qu'une graine soit produite.

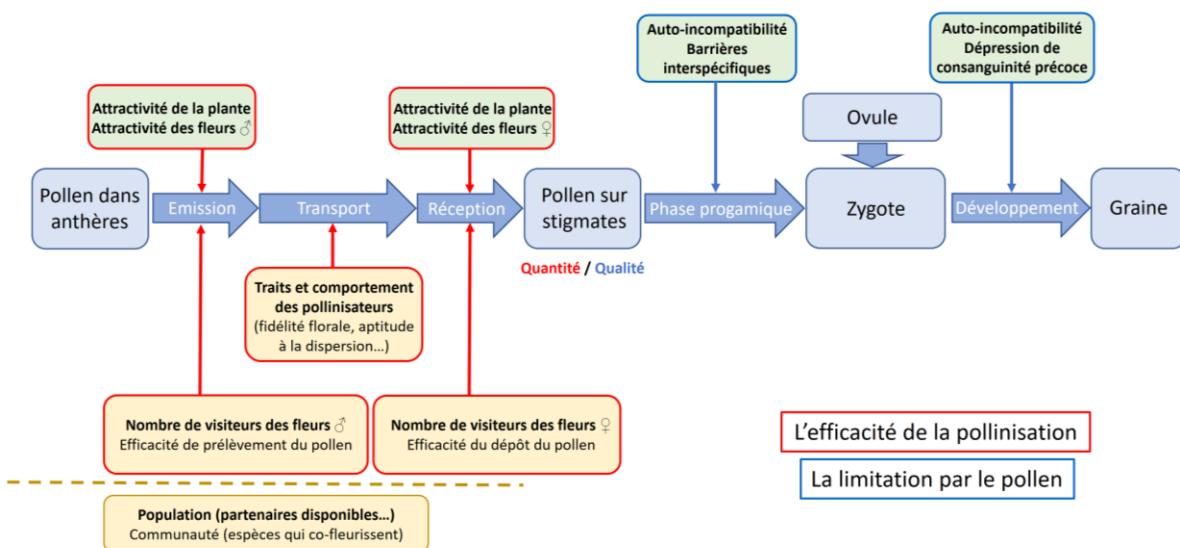


Figure 1 : Les principales étapes conditionnant la formation d'une graine

Tableau 1 : Principales causes d'une mauvaise reproduction chez les plantes à fleurs entomophiles

Etapes	Causes	Références
Pré-pollinisation	Attractivité de la plante-père insuffisante	Harder et Aizen 2010
	Insectes non-polliniseurs consommant le pollen	Harder et Aizen 2010
	Pollen perdu dans l'environnement	Wilcock et Neiland 2002 ; Harder et Aizen 2010
	Pollen produit non viable	Wilcock et Neiland 2002
Durant la pollinisation	Insectes polliniseurs trop rares ( <i>pollinators limitation</i> )	Wilcock et Neiland 2002 ; Harder et Aizen 2010
Réception du pollen	Plante isolée, pas assez d'individus donneurs de pollen ( <i>pollenizer limitation</i> )	Harder et Aizen 2010
	Phénologie incompatible	Harder et Aizen 2010
	Faible attractivité de la plante-mère pour les polliniseurs	Wilcock et Neiland 2002 ; Harder et Aizen 2010
Post-pollinisation - prézygotique	Pas de pollen conspécifique	Wilcock et Neiland 2002
	Pas de pollen compatible	Wilcock et Neiland 2002
	Interférence mécanique ( <i>pollen clogging</i> )	Wilcock et Neiland 2002 ; Barrett 2002a
Post-pollinisation - postzygotique	Auto-incompatibilité	Harder et Aizen 2010
	Auto-incompatibilité tardive	Wilcock et Neiland 2002 ; Barrett 2002a
Post-pollinisation - postzygotique	Mort du zygote	Harder et Aizen 2010

## La limitation par le pollen

Lorsque qu'une plante reçoit un mélange de pollen de bonne qualité, où tous les grains de pollen sont potentiellement fécondants, le succès de la pollinisation n'est limité que par la quantité de pollen reçu (Figure 2, d'après Aizen et Harder 2007, courbe verte). Un plateau est rapidement atteint lorsque chaque fleur femelle donne une graine, mais avant celui-ci, une légère augmentation de la quantité de

pollen reçu peut avoir un fort effet positif sur le succès de la pollinisation. Toutefois, le mélange de pollen reçu par une plante est rarement parfaitement fécondant. Deux types de limitation par la qualité du pollen reçu peuvent être distingués, suivant qu'il y a ou non interférence du pollen avec les ovules. Dans le cas d'une limitation du succès de la pollinisation avec du pollen qui n'interfère pas avec les ovules (Figure 2, courbe bleue), tout fonctionne comme si le pollen fécondant était dilué dans du pollen non fécondant. Il faut alors que la quantité de pollen reçu augmente plus fortement que dans le cas précédent pour que le succès de la pollinisation augmente d'autant. Mais si la quantité de pollen reçu est suffisante, toutes les fleurs femelles donneront une graine. Par contre, dans le cas d'une limitation du succès de la pollinisation avec du pollen qui interfère avec les ovules (Figure 2, courbe rouge), une partie des ovules est gaspillée : passé un certain seuil, l'augmentation de la quantité de pollen reçu ne permet plus d'augmenter le succès de la pollinisation. C'est notamment le cas lorsque de l'autopollen féconde des ovules mais que les zygotes avortent avant que la graine ne soit produite. Ces différents mécanismes de limitation par la qualité avec et sans interférence peuvent se combiner (Figure 2, courbe noire).

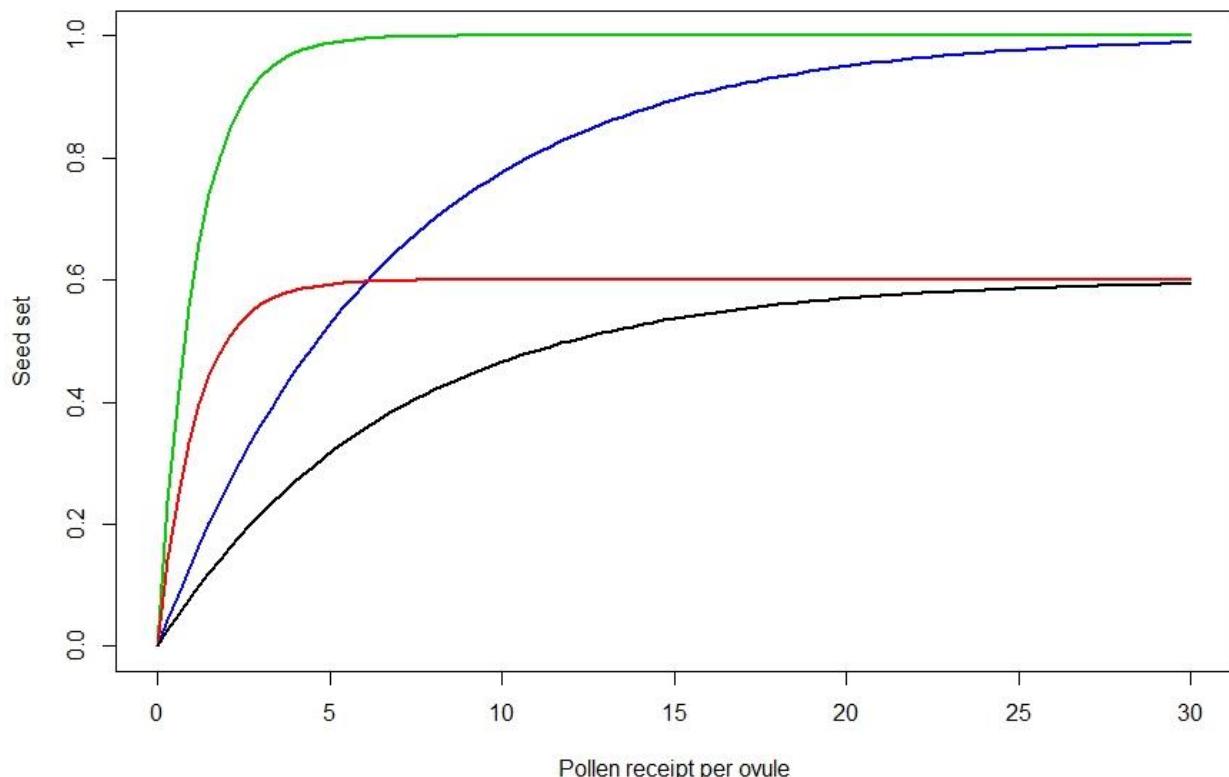


Figure 2 : Limitation du succès de la pollinisation (seed set) par la quantité et la qualité de pollen reçu par ovule. Courbe verte : limitation par la quantité seule. Courbe bleue : limitation par la qualité du pollen, sans interférence avec les ovules. Courbe rouge : idem mais avec interférence du pollen sur les ovules. Courbe noire : limitation par la qualité du pollen, avec et sans interférence sur les ovules. D'après Aizen et Harder (2007).

## Ajouter du pollen pour estimer la limitation par le pollen ?

Habituellement, pour estimer la limitation par le pollen, du pollen est ajouté manuellement sur des fleurs femelles (*pollen supplementation*), et le succès de la pollinisation de ces fleurs ayant reçu du pollen de façon illimitée est comparé au succès de la pollinisation de fleurs femelles témoins, en pollinisation ouverte. Mais cette méthode a été fortement critiquée par Aizen et Harder (2007), qui expliquent que si on ajoute un mélange de pollen de qualité différente de celui reçu naturellement par la plante, les résultats seront difficiles à interpréter. Or, la composition précise du mélange de pollen reçu est rarement connue. S'il est possible de différencier le pollen produit par différentes espèces de plantes, par des approches microscopiques basées sur la morphologie des grains de pollen, ou par des approches de metabarcoding (Poron et al. 2019), il est beaucoup plus difficile de différencier l'autopollen de l'allopollen : très peu de méthodes ont été développées pour cela à ce jour. Dans ces expériences de supplémentation, il n'est donc pas possible de différencier l'effet de la quantité et de la qualité du pollen sur le succès de la pollinisation, limitant fortement l'intérêt de l'approche.

## Les arbres, parents pauvres des travaux sur la pollinisation ?

Autant les arbres entomophiles forestiers ont constitué de bons modèles pour les travaux sur le système d'appariement, autant l'écologie de leur pollinisation reste peu connue, malgré leur abondance dans les écosystèmes. Prenons l'exemple des données du programme SPIPOLL (Suivi Photographique des Insectes POLLinisateurs). Ce programme de sciences participatives lancé en 2010 par le Muséum National d'Histoire Naturel rassemble des inventaires photographiques d'insectes, appelés « collections », réalisés sur une espèce de plante identifiée pendant une durée de 20 minutes. Dans cette base de données, assemblée en 2018, 125 taxons de plantes possédaient plus de 10 collections, ce qui représente au total 18 089 collections. On retrouve seulement 14 arbres parmi ces 125 taxons de plantes ; les arbres fruitiers et surtout les arbres forestiers arrivent loin derrière (Tableau 2 et Figure 3). Pour beaucoup de ces arbres, on connaît aussi assez mal la dépendance de leur reproduction aux insectes pollinisateurs (Klein et al. 2007 ; Deguines et al. 2014 ; Garcia et al. 2021), et les insectes impliqués.

Tableau 2: Classement de 14 taxons d'arbres étudiés parmi les 125 taxons de plantes suivis par le SPI POLL

Taxons de plantes	# Collections	Position
Les Abricotiers, Pruniers et Amandiers à fleurs blanches géminées	236	21
Le Prunier épineux	127	38
Les Cerisiers à fleurs blanches en grappes	104	46
Les Pommiers	85	54
Les Saules arbres	83	55
Le Sureau noir	50	81
Les Pêchers et Cerisiers à fleurs roses en grappes	45	93
Les Poiriers	32	113
L'Arbre de Judée	23	120
Les Tilleuls	19	121
Les Erables à feuilles simples et à inflorescences en corymbe	17	122
Le Robinier faux-Acacia	15	123
Les Noisetiers	13	124
Le Châtaignier	10	125
Total	859	

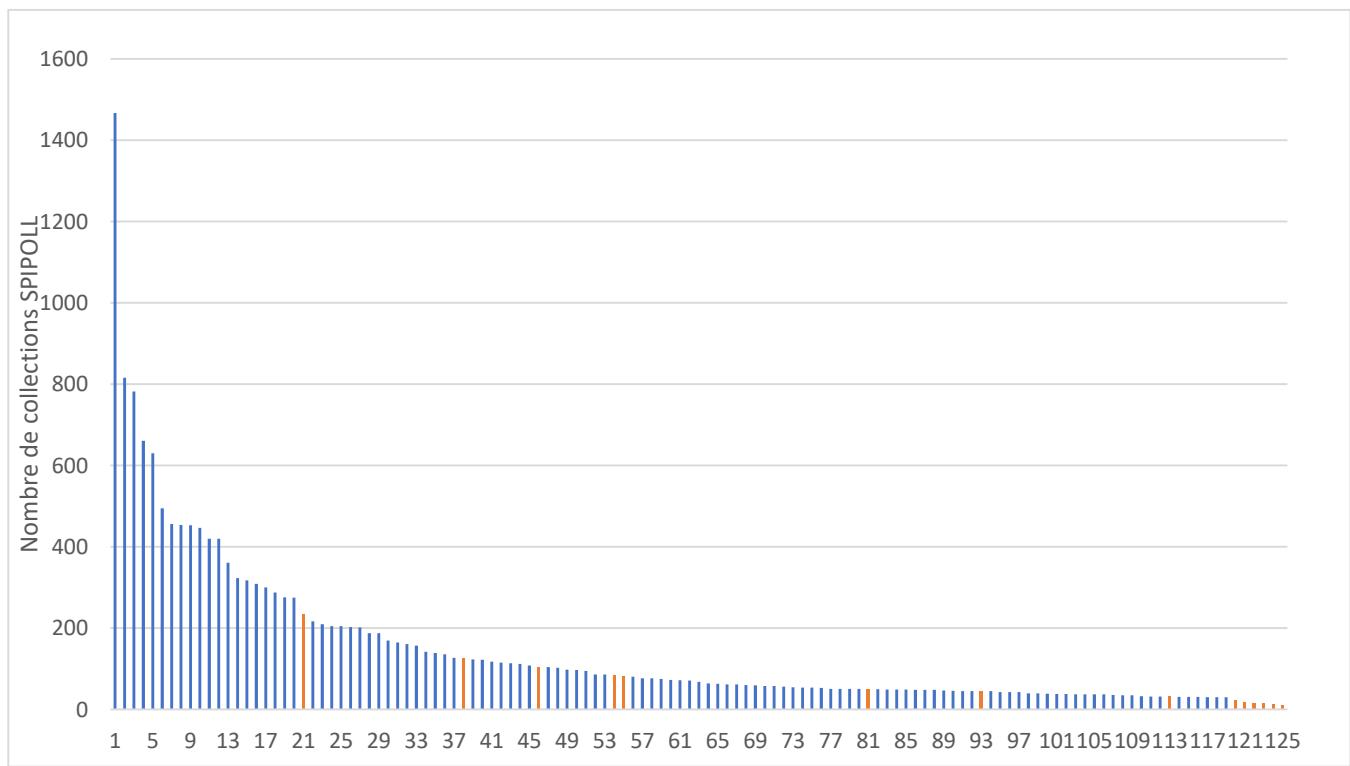


Figure 3 : Classement des 125 taxons de plantes étudiés dans le programme SPI POLL en fonction du nombre de collection. Les taxons d'arbres sont en orange.

## Le modèle d'étude

Mon travail de thèse a porté sur un arbre forestier et fruitier de premier plan, le châtaignier. Pour étudier correctement le succès de la pollinisation, il faut s'intéresser simultanément à la production de pollen, à son transport jusqu'aux stigmates, et aux premières étapes de la formation des fruits. Il faut pour cela disposer d'un modèle biologique qui permette de combiner l'étude de la fécondité mâle et de l'appariement, grâce à un modèle spatialement explicite basé sur les analyses de paternité, et l'étude du succès de la pollinisation, estimé grâce à la mesure de la proportion de fruits pleins. Le châtaignier remplissait ce cahier des charges. De plus, les attentes de la filière castanéicole pour mieux comprendre la pollinisation de cet arbre fruitier étaient grandes.

Au sein de la famille des Fagacées, qui inclut aussi les hêtres et les chênes, le genre *Castanea* (châtaigniers) est le plus petit : il contient seulement sept espèces distribuées dans l'hémisphère nord, parmi lesquelles on retrouve quatre espèces d'arbres écologiquement et économiquement importantes, le châtaignier européen (*Castanea sativa*), exploité pour son bois très recherché et cultivé pour ses fruits, les châtaignes, le châtaignier japonais (*C. crenata*), cultivé au Japon pour ses fruits, le châtaignier chinois (*C. mollissima*), qui a été planté massivement ces dernières décennies en Chine et qui est maintenant la première espèce de châtaignier cultivé dans le monde, de très loin, et enfin le châtaignier américain (*C. dentata*), qui est un arbre emblématique de la côte Est des Etats-Unis considéré comme « écologiquement éteint », car dévasté au 20<sup>ème</sup> siècle par la maladie du chancre de l'écorce (Pereira-Lorenzo et al. 2012).

En Europe, la production de châtaignes a diminué fortement depuis le 19<sup>ème</sup> siècle (Food and Agriculture of the United Nations 2020), l'âge d'or de sa culture (Pitte 1986). Mais depuis le début des années 2000, sa production s'est stabilisée et augmente légèrement, atteignant environ 150 000 tonnes par an. En France, cette production est passée d'environ 500 000 tonnes au milieu du 19<sup>ème</sup> siècle (selon Pitte, 1986) à 75 000 tonnes dans les années 1960 puis à seulement 8000 tonnes actuellement. La France, qui possède pourtant la plus grande surface de forêts de châtaignier mondiale (750 000 ha, ce qui fait du châtaignier la septième espèce d'arbre au niveau national), doit désormais importer des fruits d'autres pays d'Europe pour répondre à la demande intérieure croissante (Eurocastanea et AREFLH 2019).

Pour faire face aux maladies de l'encre et le chancre de l'écorce, venues d'Asie, qui ravagent les forêts et les vergers de châtaignier, des programmes de sélections de variétés hybrides ont débuté dans les années 40. En effet, les châtaigniers japonais et chinois, qui ont co-évolué avec ces maladies, sont plus résistants. Deux porte-greffes ont été sélectionnés, 'Marsol' et 'Maraval', et plusieurs variétés fruitières comme 'Marigoule' et 'Bouche de Bétizac', qui représentent désormais la majorité des vergers du sud-ouest de la

France (Breisch 1995). Ce sont des variétés clonales, c'est-à-dire qu'un génotype est propagé par greffe, ou produit par culture *in vitro*. Ainsi tous les plants d'une même variété sont génétiquement identiques et très semblables phénotypiquement.

Les variétés de châtaignier sont classées en différentes catégories suivant les caractéristiques de leurs fleurs mâles, notamment la longueur des filaments des étamines, qui renseignerait sur leur fertilité mâle (Solignat et Chapa 1975). Les variétés astaminées produiraient peu ou pas de pollen. Seules les variétés longistaminées, dont les filaments d'étamines sont longs (5 à 7 mm), produiraient du pollen viable en grande quantité. Sisco et al. (2014) ont proposé que la stérilité mâle du châtaignier est d'origine cytoplasmique. Disposer d'arbres produisant ou non du pollen présente un grand avantage pour étudier l'écologie de la pollinisation d'une espèce, que j'ai mis à profit à plusieurs reprises dans cette thèse. En effet, pour presque chaque sujet exploré, j'ai utilisé le contraste entre arbres mâle-stériles (produisant très peu de pollen) et mâle-fertiles (produisant beaucoup de pollen). J'ai aussi profité du fait que les inflorescences mâles et femelles soient séparées pour distinguer les insectes polliniseurs des simples visiteurs.

Le châtaignier étant largement auto-stérile (Breisch 1995 ; Xiong et al. 2019), la pollinisation croisée est quasiment obligatoire. Les mécanismes identifiés sont tout d'abord une auto-incompatibilité tardive de type prézygotique (le tube pollinique atteint l'ovule mais n'y pénètre pas toujours, résultant en un développement anormal du sac embryonnaire). Ensuite, en cas de fécondation par l'auto-pollen, une dépression de consanguinité précoce aboutit fréquemment à l'avortement de l'embryon à différents stades (Xiong et al. 2019).

Concernant les croisements interspécifiques, il est relativement facile d'obtenir des hybrides en croisant deux espèces différentes de châtaignier, aucune barrière interspécifique absolue n'ayant été mises en évidence. Toutefois, suivant l'identité du père (son espèce ou sa variété) utilisé lors de croisements contrôlés, le succès de la pollinisation varie fortement (Invenio 2021).

Les bogues du châtaignier contiennent presque toujours trois fruits. Une fleur femelle, si elle est pollinisée, donne un akène, la châtaigne. Si elle n'est pas pollinisée, l'akène se développe mais aucune graine ne se trouve à l'intérieur du péridyme. La proportion de fruits pleins a été utilisée comme indicateur du succès de la pollinisation dès le début du programme de sélection des variétés de châtaignier : j'ai tenté de confirmer l'intérêt de cette mesure pour l'étude de la pollinisation avant de l'exploiter pour évaluer le succès de la pollinisation.

## Plan

J'ai choisi de présenter mon travail en cinq chapitres. Ils commencent par un préambule dans lequel j'aborde très brièvement les sujets explorés (sections 1.1., 2.1., 3.1., 4.1. et 5.1.). En effet l'objectif n'était pas de reprendre de manière approfondie les questions de recherche, ceux-ci étant présentés dans chaque papier. Ces préambules sont suivis de 2 à 4 sections correspondant à des notes ou à des articles, à des stades d'avancement hétérogènes. Certains articles sont déjà publiés : quatre articles scientifiques en anglais : 1.2., 1.3., 1.4. et 2.2. ; un article de vulgarisation en français : 5.2., suivi d'autres documents illustrant mes efforts de communication pendant cette thèse (5.3. et 5.4.). Ensuite, deux manuscrits rédigés en anglais ont vocation à être soumis pour publication après quelques compléments et corrections (3.5. et 4.3.). Enfin je présente des notes en français présentant d'autres résultats de recherche originaux obtenus durant ma thèse (2.3., 2.4., 2.5., 3.2., 3.3., 3.4., 4.2.). Ils pourront être publiés à terme après avoir été profondément remaniés et réorganisés, et parfois complétés, mais il m'a semblé pertinent à ce stade de les présenter sous forme d'éléments de recherche autonomes, avec les références associées, même si cela induit quelques répétitions. Une discussion générale et des annexes viennent ensuite.

## APERÇU DES METHODES UTILISEES ET CHRONOLOGIE DES OBSERVATIONS ET EXPERIENCES

Le **chapitre 1** présente le site d'étude principal et les principales méthodes de phénotypage et de génotypage utilisées au cours de cette thèse. Le châtaignier étant utilisé sous forme de variétés propagées par greffe, il fallait pouvoir les identifier. De même, plusieurs espèces de châtaignier et leurs hybrides sont utilisés dans les vergers, il fallait aussi pouvoir les différencier. Enfin, il était impératif de pouvoir, dans ce travail sur la pollinisation, caractériser la phénologie de la floraison des arbres et déterminer ceux présentant une stérilité mâle. Ce travail nécessaire a donc servi de fondation aux autres chapitres.

Le premier thème majeur abordé dans cette thèse est le rôle des insectes dans la pollinisation du châtaignier. Il est traité dans le **chapitre 2**. Pour clarifier le rôle des insectes, nous avons utilisé deux types d'approches : expérimentales et descriptives. Pour la partie expérimentale, nous avons comparé la production de fruits pour des fleurs de châtaignier en pollinisation libre à la production de fruits pour des fleurs de châtaignier rendues inaccessibles aux insectes mais toujours accessibles au pollen présent dans l'air, à l'aide de filets. Il nous fallait un verger avec des arbres génétiquement homogènes, afin d'avoir un nombre suffisant de répétitions (tableau 1) et si possible plusieurs variétés mâle-stériles et mâle-fertiles. Pour ces raisons, nous avons choisi les vergers d'Invenio en Dordogne. Au printemps 2020, nous avons répété l'expérience d'exclusion des insectes sur plusieurs arbres de la collection INRAE à Villenave

d'Ornon près de Bordeaux. Cette fois-ci nous avons utilisé des filets avec des mailles de tailles différentes. Nous avons encore cherché à perfectionner cette expérience en 2021, en combinant deux types de filets.

Une fois le rôle clé des insectes mis en avant, il fallait identifier les insectes pollinisateurs du châtaignier. Ce travail a été commencé en 2019 sur des châtaigniers de la collection INRAE à Villenave d'Ornon. Nous avons poursuivi et amélioré ces suivis d'insectes sur le même site en 2021, en observant plus longtemps les fleurs femelles et le comportement des insectes. Nous avons aussi étudié plus brièvement les insectes floricoles du châtaignier sur d'autres sites, y compris forestiers. Nous avons capturé, au printemps 2020, sur différentes variétés de châtaignier mâle-stériles et mâle-fertiles de la collection INRAE, un peu plus de 600 téléphores faunes (*Rhagonycha fulva*), un coléoptère de la famille des cantharidés, l'espèce d'insecte la plus abondante dans le verger étudié (tableau 1). Nous avons caractérisé les charges polliniques de 300 individus mâles et femelles. Ces résultats préliminaires sont aussi présentés dans le chapitre 2. Nous testons également dans ce chapitre si les arbres mâle-stériles demeurent attractifs pour les insectes pollinisateurs et si les insectes récoltés sur les arbres mâle-fertiles ont de plus grandes charges en pollen que ceux récoltés sur des arbres mâle-stériles

Dans le **chapitre 3**, l'objectif est cette fois d'étudier comment ce polymorphisme sexuel affecte le succès de la pollinisation. Dans un premier temps, j'explore, de façon encore très préliminaire, l'origine et la nature de la stérilité mâle du châtaignier. Le polymorphisme sexuel est étudié dans deux forêts présumées naturelles de châtaignier, en Espagne et en France. Puis, pour caractériser le mode de transmission du phénotype mâle-stérile, des marqueurs chloroplastiques ont été développés et utilisés pour caractériser génétiquement la collection INRAE de châtaignier. Les informations disponibles sur les pédigrés des arbres de la collection permettent de tirer des premières conclusions sur l'hérédité de la stérilité mâle.

Un objectif majeur de ce travail, d'un grand intérêt pratique et théorique, est d'arriver à prédire le succès de l'appariement femelle, c'est-à-dire la probabilité qu'une fleur femelle soit pollinisée, puis qu'elle soit fécondée et qu'elle forme un fruit. Pour étudier les conséquences de la pollinisation sur la production de fruits, de nombreuses données ont été recueillies à la fin du printemps, lorsque le châtaignier fleurit (fin mai – début juillet) et à l'automne, lorsque les châtaignes arrivent à maturité (mi-septembre – mi-octobre), durant quatre saisons (de mai 2018 à novembre 2021). Les fleurs femelles des châtaigniers sont rassemblées en petites inflorescences comprenant typiquement trois fleurs. Notre hypothèse est que chaque fleur, si elle est pollinisée par du pollen compatible, donne un fruit (un akène) constitué presque tout le temps d'une seule graine. Mais si cette fleur femelle n'est pas pollinisée, ou est pollinisée par du pollen inadéquat, le fruit formé reste vide. Donc pour estimer la qualité du service de pollinisation, il suffirait de compter le nombre de fruits remplis et le nombre de fruits vides. Quand les bogues ne contiennent que des fruits vides, elles peuvent ou pas se développer. Nous avons donc développé une

mesure de taux de remplissage corrigée basée sur les seules bogues présentant au moins un fruit développé. Le taux de remplissage des bogues de tous les arbres de la collection INRAE de châtaignier a été évalué avec cette approche simplifiée en 2018 et en 2019, ce qui représente plus de 14.000 bogues examinées. En 2020 et 2021, nous avons aussi suivi des cohortes de fleurs sur plusieurs rameaux de plusieurs arbres pour tester la pertinence de la correction effectuée. Nous testons aussi dans ce chapitre si les ressources disponibles pour l'arbre-mère affectent le nombre de fleurs devenant des fruits.

Le dernier article du chapitre 3 se focalise sur un mécanisme rarement mis en avant pour expliquer l'évolution de sexes séparés chez les plantes : l'interférence entre les fonctions mâle et femelle d'un même individu, notamment l'effet négatif de l'auto-pollinisation sur les ovules. J'ai sélectionné plusieurs variétés mâle-stériles et mâle-fertiles dans les vergers d'Invenio. Au printemps 2019, avant que les arbres n'émettent du pollen, nous avons émasculé les arbres sélectionnés (tableau 1), c'est-à-dire que nous avons coupé les chatons mâles avant que les étamines ne libèrent le pollen, puis nous avons évalué l'automne suivant les conséquences sur le taux de remplissage des bogues.

Dans le **chapitre 4**, je présente d'abord une étude de paternité dans cinq vergers de producteurs ayant des rendements très hétérogènes. Je présente ici les résultats obtenus pour trois de ces cinq vergers, et teste s'il y a un lien entre le nombre de donneurs de pollen et le succès de la pollinisation. Un des objectifs est de quantifier la proportion de fruits engendrés par des arbres extérieurs au verger, notamment par les châtaigniers forestiers du voisinage. Un des objectifs majeurs de la thèse était d'alimenter et valider un modèle bayésien de l'appariement de type MEMM - *Mixed Effects Mating Model*, étendu pour inclure pour la première fois le succès de la pollinisation, estimé grâce au taux de remplissage des bogues. Grâce à ce modèle spatialement explicite, conçu par Etienne Klein (INRAE Avignon), nous pouvons modéliser les nuages de pollen, estimer la fécondité mâle des arbres, et ainsi tenter de comprendre pourquoi certains arbres engendent plus de fruits que d'autres. Pour cela, il fallait un site d'étude le plus isolé possible et ayant ni trop ni trop peu d'arbres donneurs de pollen, afin de pouvoir les échantillonner exhaustivement et ainsi maximiser les chances de retrouver les pères des fruits. Ensuite, il fallait pouvoir accéder facilement aux arbres pour les échantillonner, les mesurer et les cartographier. Enfin, il fallait que la diversité génétique du châtaignier soit importante afin d'étudier les compatibilités entre espèces et entre variétés typiquement utilisées en castanéiculture et explorer toute l'étendue de la variabilité phénotypique de ces espèces. La collection INRAE de châtaignier était donc idéale pour cela. Pour les analyses de paternité, chaque fruit est pesé individuellement et l'ADN est extrait à partir de la plantule présente dans la châtaigne. J'ai réalisé une première étude de paternité de grande ampleur dans la collection INRAE sur des fruits récoltés en 2018, puis une autre sur des fruits récoltés en 2019, dont les résultats ne seront pas présentés ici.

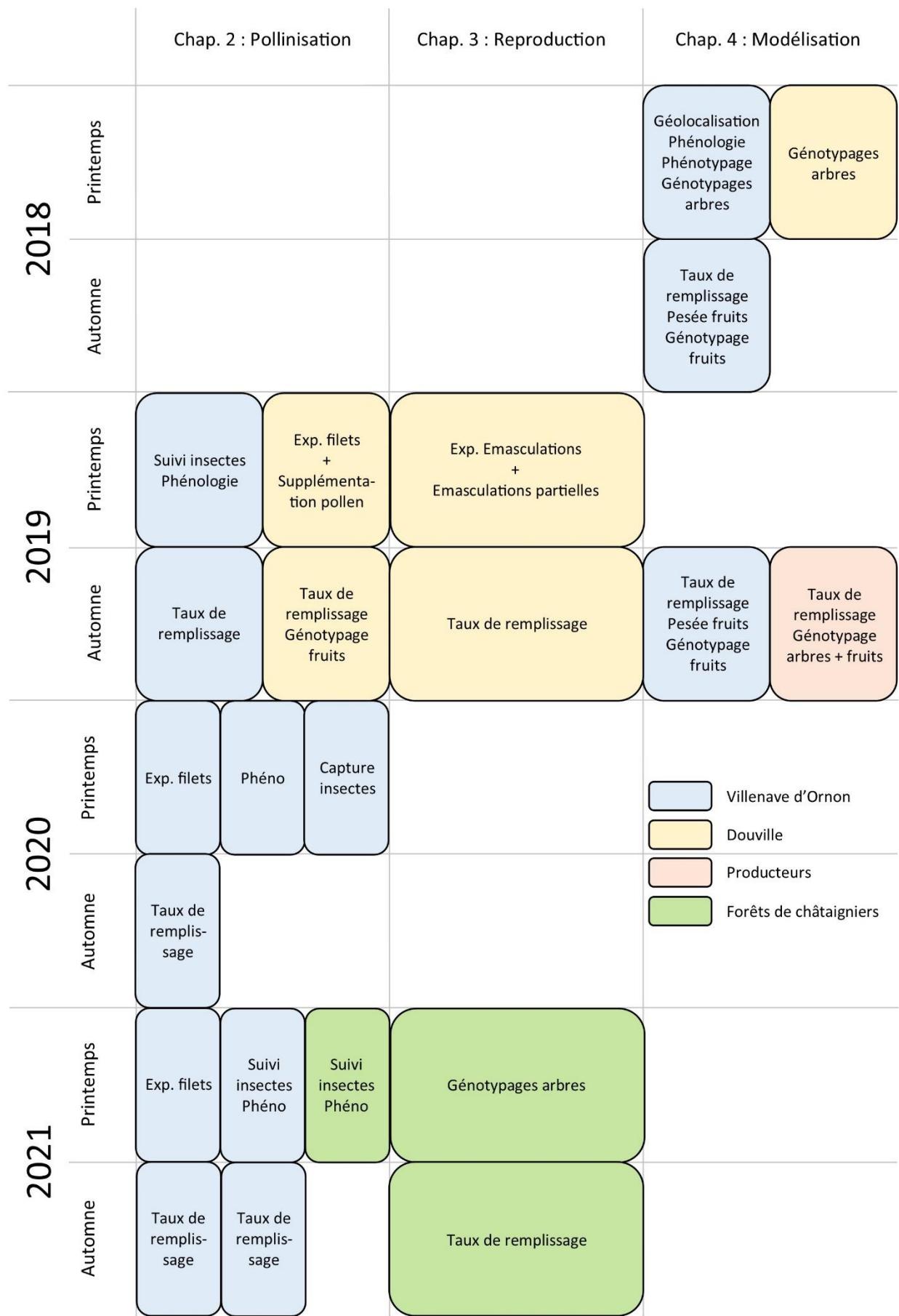


Figure 4 : Sites d'expérimentation, chronologie des observations et données récoltées

Tableau 3: Détails des données récoltées pendant ma thèse

Actions	Lieux	2018	2019	2020	2021
Géolocalisation	Villenave Aldudes	<b>275</b>			88
Phénologie <sup>1</sup>	Villenave	<b>242</b>	<b>16</b>		11
Suivi d'insectes	Villenave		<b>16</b>		11
Captures d'insectes	Villenave			<b>600</b>	
Phénotypage	Villenave	<b>244</b> <sup>2</sup>		<b>16</b> <sup>3</sup>	
Génotypages arbres	Villenave Douville Aldudes Producteurs	<b>273</b> 77 30 99	<b>13</b>		84 118
Pesées fruits	Villenave Douville Producteurs	~7500 420 523	~1900/~21500 <sup>4</sup>		
Génotypages fruits	Villenave Douville Producteurs	<b>2100</b> 408 321	680 321		
Expérimentation	Douville dont émasculation dont filets		<b>93</b> <b>45</b> <b>31</b>		
	Villenave # modalité filets <sup>5</sup>			5 2	5 4
Remplissage bogues <sup>6</sup>	Villenave Douville Producteurs	<b>225</b> 119 32	<b>239</b> 119 32	<b>15</b>	25

<sup>1</sup> Chaque arbre reçoit 3 notes à chaque passage. Nous avons réalisé 11 passages en 2018 et 12 passages en 2019 et 2020.

<sup>2</sup> Afin de décrire la capacité des arbres à produire du pollen, nous avons évalué pour chaque arbre 17 variables en lien avec leur fécondité mâle.

<sup>3</sup> Afin de décrire l'architecture florale des arbres et le ratio pollen/ovules, nous avons évalué pour chacun de ces 16 arbres 17 variables.

<sup>4</sup> Lors de la mesure de taux de remplissage, tous les fruits développés de chaque arbre ont été pesés afin de calculer le poids moyen des fruits développés pour chaque arbre.

<sup>5</sup> Nombre de modalités différentes utilisant des filets

<sup>6</sup> Le taux de remplissage des bogues est mesuré sur un échantillon de 20 bogues, sauf dans la collection INRAE où 30 bogues ont été utilisées à partir de 2019.

Si on fait le bilan (figure 4 et tableau 3), pour l'étude du mode de pollinisation (chapitre 2), les insectes ont été suivis pendant deux printemps à Villenave d'Ornon : sur 16 arbres en 2019 (12 passages) et sur 8 arbres en 2021 (12 passages). La modalité d'exclusion des insectes a été appliquée sur 31 arbres et comparée au taux de remplissage de 31 arbres témoins. Cette modalité « filet » a été répétée à Villenave d'Ornon, sur 5 arbres en 2020 et de nouveau sur 5 arbres en 2021. Pour le chapitre 3, 45 arbres ont été émasculés et arbres et comparé au taux de remplissage de 31 arbres témoins. Pour le chapitre 4, nous avons recueilli les coordonnées géographiques de 275 arbres, les génotypes de 273 arbres, environ 8000 données de phénologie, environ 5600 données de phénotypage, les génotypes de 2100 châtaignes récoltées en 2018 et de 680 châtaignes récoltées en 2019, et nous avons mesuré les taux de remplissages sur presque tous les arbres de la collection INRAE de châtaignier avec environ 4500 bogues en 2018 et 7200 bogues en 2019.

J'ai pendant ma thèse pu compter sur l'appui de nombreux collègues d'Invenio et de Biogeco et sur l'aide de plusieurs stagiaires, que j'ai co-encadrés avec Rémy Petit : Gaëlle Basset (M1, 2019) et Grégoire Pauly (M1, 2021) pour les suivis d'insectes, Eva Austruy (Ingénieure M2, 2020) pour les premières analyses de visites d'insectes des fleurs du châtaignier, Tanguy Menthonnex (L3, 2020), Julien Bonnier (L3, 2020) et Marie Rheinheimer (L2, 2021) pour la phénologie et la description des fleurs de châtaignier, et Sarah Gentet (M2, 2021 ; co-encadrée également par Olivier Lepais) pour la caractérisation des charges en pollen des téléphores fauves.

## RÉFÉRENCES

- Aizen MA, Harder LD (2007) Expanding the limits of the pollen-limitation concept: Effects of pollen quantity and quality. *Ecology* 88:271–281. <https://doi.org/10.1890/06-1017>
- Allen-Wardell G, Bernhardt P, Bitner R, et al (1998) The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conserv Biol* 12:8–17. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1998.97154.x>
- Ashley MV (2010) Plant parentage, pollination, and dispersal: How DNA microsatellites have altered the landscape. *CRC Crit Rev Plant Sci* 29:148–161. <https://doi.org/10.1080/07352689.2010.481167>
- Ayasse M (ed) (2006) Floral scent and pollinator attraction in sexually deceptive orchids. In: *Biology of Floral Scent*. CRC Press
- Barrett S (2002a) Sexual interference of the floral kind. *Heredity* 88:154–9. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800020>
- Barrett SCH (2002b) The evolution of plant sexual diversity. *Nat Rev Genet* 3:274–284. <https://doi.org/10.1038/nrg776>
- Barrett SCH, Harder LD (2017) The ecology of mating and its evolutionary consequences in seed plants. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 48:135–157. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110316-023021>
- Bauer AA, Clayton MK, Brunet J (2017) Floral traits influencing plant attractiveness to three bee species: Consequences for plant reproductive success. *Am J Bot* 104:772–781. <https://doi.org/10.3732/ajb.1600405>

- Bell G, Hamilton WD (1985) On the function of flowers. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 224:223–265. <https://doi.org/10.1098/rspb.1985.0031>
- Bennett JM, Steets JA, Burns JH, et al (2020) Land use and pollinator dependency drives global patterns of pollen limitation in the Anthropocene. *Nat Commun* 11:3999. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17751-y>
- Biesmeijer J, Roberts S, Reemer M, et al (2006) Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313:351–4. <https://doi.org/10.1126/science.1127863>
- Breisch H (1995) Châtaignes et Marrons. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, Paris, France
- Burd M (1995) Ovule packaging in stochastic pollination and fertilization environments. *Evolution* 49:100–109. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1995.tb05962.x>
- Burd M (1994) Bateman's principle and plant reproduction: The role of pollen limitation in fruit and seed set. *Bot Rev* 60:83–139. <https://doi.org/10.1007/BF02856594>
- Darwin C (1877) The different forms of flowers on plants of the same species. London UK
- Darwin C (1862) On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing. London
- de Jong TJ, Waser NM, Klinkhamer PG (1993) Geitonogamy: The neglected side of selfing. *Trends Ecol Evol* 8:321–325. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90239-L](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90239-L)
- Deguines N, Jono C, Baude M, et al (2014) Large-scale trade-off between agricultural intensification and crop pollination services. *Front Ecol Evol* 12:212–217. <https://doi.org/10.1890/130054>
- Delpino F (1874) Ulteriori osservazioni e considerazioni sulla dicogamia nel regno vegetale. 2 (IV). Delle piante zoidifile. *Atti Soc ital sci nat* 16:151–349
- Devaux C, Lande R, Porcher E (2014) Pollination ecology and inbreeding depression control individual flowering phenologies and mixed mating. *Evolution* 68:3051–3065. <https://doi.org/10.1111/evo.12507>
- Dicks LV, Breeze TD, Ngo HT, et al (2021) A global-scale expert assessment of drivers and risks associated with pollinator decline. *Nat Ecol Evol* 5:1453–1461. <https://doi.org/10.1038/s41559-021-01534-9>
- Doust JL, Doust LL (1988) Plant Reproductive Ecology: Patterns and Strategies. Oxford University Press
- Eurocastanea, AREFLH (2019) Livre blanc de la châtaigne en Europe
- Food and Agriculture of the United Nations (2020) FAOSTAT Statistical Database. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed 9 Oct 2020
- Garcia G, Re B, Orians C, Crone E (2021) By wind or wing: pollination syndromes and alternate bearing in horticultural systems. *Phil Trans R Soc B* 376:20200371. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0371>
- Hallmann CA, Sorg M, Jongejans E, et al (2017) More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLoS ONE* 12:e0185809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185809>
- Harder L, Aizen M (2010) Floral adaptation and diversification under pollen limitation. *Phil Trans R Soc B* 365:529–43. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0226>
- Harder LD, Barrett SCH (1996) Pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants. In: Lloyd DG, Barrett SCH (eds) *Floral Biology: Studies on Floral Evolution in Animal-Pollinated Plants*. Springer US, Boston, MA, pp 140–190
- Harder LD, Routley MB (2006) Pollen and ovule fates and reproductive performance by flowering plants. In: *Ecology and Evolution of Flowers*. OUP Oxford
- Harder PD of BSLD, Harder LD, Barrett SCH, Barrett P& CRCD of BSCH (2006) *Ecology and Evolution of Flowers*. OUP Oxford

Invenio (2021) Tests de pollinisations contrôlées. Douville

Kearns CA, Inouye DW, Waser NM (1998) Endangered mutualisms: The conservation of Plant-Pollinator Interactions. Annu Rev Ecol Syst 29:83–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.83>

Klein A-M, Vaissière BE, Cane JH, et al (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc R Soc B 274:303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>

Klein EK, Desassis N, Oddou-Muratorio S (2008) Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. IV. Whole interindividual variance of male fecundity estimated jointly with the dispersal kernel. Mol Ecol 17:3323–3336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03809.x>

Klein EK, Lagache L, Petit RJ (2017) Demographic and spatial determinants of hybridization rate. J Ecol 105:29–38. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12674>

Lagache L, Klein EK, Ducousoo A, Petit RJ (2014) Distinct male reproductive strategies in two closely related oak species. Mol Ecol 23:4331–4343. <https://doi.org/10.1111/mec.12766>

Lagache L, Klein EK, Guichoux E, Petit RJ (2013) Fine-scale environmental control of hybridization in oaks. Mol Ecol 22:423–436. <https://doi.org/10.1111/mec.12121>

Larson B, Barrett SCH (2000) A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. Biol J Linn Soc 69:503–520. <https://doi.org/10.1006/bijl.1999.0372>

Lloyd DG, Webb CJ (1986) The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. Dichogamy. N Z J Bot 24:135–162. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1986.10409725>

Maloof JE, Inouye DW (2000) Are nectar robbers cheaters or mutualists? Ecology 81:2651–2661. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[2651:ANRCOM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[2651:ANRCOM]2.0.CO;2)

Oddou-Muratorio S, Klein EK, Austerlitz F (2005) Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. II. Pollen dispersal and heterogeneity in mating success inferred from parent–offspring analysis. Mol Ecol 14:4441–4452. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02720.x>

Ollerton J (2021) Pollinators & Pollination: Nature and Society

Ollerton J (2008) Ecology and evolution of flowers. Syst Biol 57:516–517. <https://doi.org/10.1080/10635150802208798>

Pereira-Lorenzo S, Ballester A, Corredoira E, et al (2012) Chestnut. In: Badenes ML, Byrne DH (eds) Fruit Breeding. Springer US, Boston, MA, pp 729–769

Pitte J-R (1986) Terres de Castanide : Hommes et paysages du Châtaignier de l'Antiquité à nos jours. Fayard

Poron A, Baksay S, Escaravage N, et al (2019) Pollinator specialization increases with a decrease in a mass-flowering plant in networks inferred from DNA metabarcoding. Ecol Evol 9:13650–13662. <https://doi.org/10.1002/ece3.5531>

Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, et al (2010a) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends Ecol Evol 25:345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>

Potts SG, Roberts SPM, Dean R, et al (2010b) Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. J Apic Res 49:15–22. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.02>

Real LA, Rathcke BJ (1991) Individual variation in nectar production and Its effect on fitness in *Kalmia latifolia*. Ecology 72:149–155. <https://doi.org/10.2307/1938910>

Rodger JG, Bennett JM, Razanajatovo M, et al (2021) Widespread vulnerability of flowering plant seed production to pollinator declines. Sci Adv 7:eabd3524. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd3524>

Rodríguez-Rodríguez MC, Jordano P, Valido A (2017) Functional consequences of plant-animal interactions along the mutualism-antagonism gradient. Ecology 98:1266–1276. <https://doi.org/10.1002/ecy.1756>

Schaefer HM, Ruxton GD (2009) Deception in plants: mimicry or perceptual exploitation? Trends Ecol Evol 24:676–685. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.06.006>

Shivanna KR, Tandon R (2014) Reproductive Ecology of Flowering Plants: A Manual

Sisco PH, Neel TC, Hebard FV, et al (2014) Cytoplasmic male sterility in interspecific hybrids between American and Asian *Castanea* species is correlated with the American D chloroplast haplotype. Acta Hortic 215–222. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1019.32>

Smith GP, Bronstein JL, Papaj DR (2019) Sex differences in pollinator behavior: Patterns across species and consequences for the mutualism. J Anim Ecol 88:971–985. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12988>

Solignat G, Chapa J (1975) La Biologie florale du Châtaignier. Institut National de Vulgarisation pour les Fruits Légumes et Champignons, PARIS

Stanton ML, Snow AA, Handel SN (1986) Floral evolution: attractiveness to pollinators increases male fitness. Science 232:1625–1627

Stephenson AG (1981) Flower and fruit abortion: Proximate causes and ultimate functions. Ann Rev Ecol Syst 12:253–279

Vereecken NJ, Cozzolino S, Schiestl FP (2010) Hybrid floral scent novelty drives pollinator shift in sexually deceptive orchids. BMC Evol Biol 10:103. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-103>

Webb CJ, Lloyd DG (1986) The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. N Z J Bot 24:163–178. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1986.10409726>

Wilcock CC, Neiland MRM (2002) Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. Trends Plant Sci 7:270–277. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02258-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02258-6)

Willmer P (2011) Pollination and floral ecology. Pollination and Floral Ecology. <https://doi.org/10.1515/9781400838943>

Xiong H, Zou F, Guo S, et al (2019) Self-sterility may be due to prezygotic late-acting self-incompatibility and early-acting inbreeding depression in Chinese chestnut. J Am Soc Hortic Sci 144:172–181. <https://doi.org/10.21273/JASHS04634-18>



# Chapitre 1

---

Une boîte à outils pour l'étude de la pollinisation







## Préambule

L'objectif de cette thèse est de mieux comprendre toutes les étapes de la pollinisation du châtaignier, comme exposé précédemment. J'ai tenté d'étudier le processus de pollinisation dans sa globalité, depuis l'émission de pollen jusqu'à la production de fruits. Pour cela, j'ai dû prendre en compte les particularités de cette espèce et ses traits de vie qui sont susceptibles de jouer un rôle dans la pollinisation, et développer de nouvelles méthodes pour décrire et caractériser son système d'appariement.

Une grande partie du travail de terrain a été effectuée dans le campus INRAE de la Grande Ferrade à Villenave d'Ornon. C'est là qu'est hébergée la collection INRAE de châtaignier. Comme préalable à tous les travaux suivants, nous avons caractérisé le phénotype et le génotype de tous les arbres du dispositif, afin notamment d'identifier les variétés de châtaignier propagées par greffe, les espèces auxquelles elles appartiennent, et le type sexuel de chaque arbre (mâle-fertile ou mâle-stérile).

Nous avons utilisé au total 17 variables pour caractériser précisément le phénotype des arbres et leur capacité à produire du pollen. Des mesures de phénotypage plus détaillées ont été effectuées en 2020 sur 16 arbres, pour quantifier notamment les proportions des différents types de fleurs et le ratio pollen/ovules.

Pour étudier la phénologie de la floraison du châtaignier, il n'y avait pas de méthode adaptée au début de cette thèse. L'échelle de l'observatoire des saisons (Badeau et al. 2017) décrit la phénologie d'un seul type de fleur, tandis que l'ancienne notation INRA (Breisch 1995) ne différencie pas les fleurs mâles et les fleurs femelles des chatons bisexués. J'ai donc développé une échelle spécifique au châtaignier, répondant aux normes internationales de standardisation, en attribuant trois notes aux fleurs de l'arbre. Les résultats sont présentés dans le premier article de ce chapitre, intitulé « **Efficient monitoring of phenology in chestnuts** » publié dans la revue *Scientia Horticulturae* (Larue et al. 2021a)

En 2021, pour mieux appréhender la phénologie de l'arbre, nous avons comparé l'approche BBCH globale au niveau de l'arbre à une approche plus détaillée de la proportion de fleurs mâles émettant du pollen et du nombre de fleurs femelles réceptives, en s'inspirant du travail d'Hasegawa et al. (2017). Les analyses sont en cours.

Pour extraire de l'ADN de châtaignier de qualité à partir de feuilles ou de fruits, les protocoles d'extraction existants ont dû être adaptés, car les feuilles de châtaignier sont riches en tannins et les fruits sont riches en polysaccharides, composés qui interfèrent avec les analyses moléculaires : les premiers sont des inhibiteurs de PCR, les seconds rendent les solutions visqueuses et difficiles à pipeter. J'ai donc développé un protocole d'extraction d'ADN original au format de plaques de 96 échantillons pour extraire

simultanément l'ADN d'un grand nombre d'échantillons riches en polysaccharides et en tannins (Annexe 1).

Pour caractériser génétiquement tous les arbres du dispositif, des marqueurs microsatellites étaient disponibles au début de ce travail (Buck et al. 2003 ; Marinoni et al. 2003 ; Durand et al. 2010) mais nous avons décidé de développer des marqueurs SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Nous souhaitions en effet disposer d'un débit suffisant en termes de génotypage et de lecture des données, le tout à un coût abordable. Un autre intérêt des marqueurs SNP pour ce type de recherches est le faible taux de mutation, comparé aux microsatellites (Guichoux et al. 2011). Nous avons donc mis au point deux jeux de 40 marqueurs SNP chacun. Le travail correspondant constitue le second article de ce chapitre. Il est publié dans la revue *Conservation Genetic Ressources* et s'intitule « **Development of highly validated SNP markers for genetic analyses of chestnut species** » (Larue et al. 2021c). Dans cet article, je fais le bilan des deux années de tests réalisés avec la plateforme génome-transcriptome de Bordeaux (PGTB), et je présente les 79 marqueurs SNP utilisés tout au long de la thèse.

Pour augmenter la résolution et pouvoir diagnostiquer les croisements complexes, voire intégrer plus tard l'apparentement dans les modèles d'intercompatibilité des arbres, nous avons également développé 98 marqueurs microsatellites. Ces marqueurs sont présentés dans un article que j'ai co-signé, qui s'intitule « **Microhaplotype genotyping-by-sequencing of 98 highly polymorphic markers in three chestnut tree species** » et qui est également publié dans *Conservation Genetic Ressources* (Laurent et al. 2020, annexes). Ils sont caractérisés par séquençage grâce à une méthode novatrice mise au point au sein de l'UMR Biogeco (Lepais et al. 2020). Grâce à cette méthode, nous avons pu caractériser génétiquement avec une grande puissance de résolution tous les génotypes uniques de la collection de châtaignier INRAE.

Cette collection INRAE de châtaignier et les principales données de phénotypage et de génotypage sont présentées sous forme d'un *data paper* récemment publié dans *Annals of Forest Sciences*, intitulé « **An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction** » (Larue et al. 2021b).

J'ai aussi co-signé un article intitulé « **Sixty years from the first disease description, a novel badnavirus associated with chestnut mosaic disease** » et publié dans la revue *Phytopathology* (Maraïs et al. 2021). J'avais apporté mon expertise pour l'extraction d'ADN à partir de feuilles de châtaignier, afin de tester si des arbres étaient porteurs ou non de la mosaïque du châtaignier, une maladie dont doivent être exempts les plants de châtaignier vendus en pépinière et qui est difficile à détecter par indexage

## REFERENCES

Badeau V, Bonhomme M, Bonne F, et al (2017) Les plantes au rythme des saisons, Biotope éditions

- Breisch H (1995) Châtaignes et Marrons. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, Paris, France
- Buck EJ, Hadonou M, James CJ, et al (2003) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). Mol Ecol Notes 3:239–241. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00410.x>
- Durand J, Bodénès C, Chancerel E, et al (2010) A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. BMC Genomics 11:570. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-570>
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, et al (2011) Current trends in microsatellite genotyping. Mol Ecol Resour 11:591–611. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>
- Hasegawa Y, Suyama Y, Seiwa K (2017) Flowering phenology of a duodichogamous self-incompatible tree species, *Castanea crenata*. Jpn J Ecol 67:31–39. [https://doi.org/10.18960/seitai.67.1\\_31](https://doi.org/10.18960/seitai.67.1_31)
- Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021a) Efficient monitoring of phenology in chestnuts. Sci Hortic 281:109958. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109958>
- Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021b) An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction. Ann For Sci 78:90. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01104-w>
- Larue C, Guichoux E, Laurent B, et al (2021c) Development of highly validated SNP markers for genetic analyses of chestnut species. Conserv Genet Resour. <https://doi.org/10.1007/s12686-021-01220-9>
- Laurent B, Larue C, Chancerel E, et al (2020) Microhaplotype genotyping-by-sequencing of 98 highly polymorphic markers in three chestnut tree species. Conserv Genet Resour. <https://doi.org/10.1007/s12686-020-01157-5>
- Lepais O, Chancerel E, Boury C, et al (2020) Fast sequence-based microsatellite genotyping development workflow. PeerJ 8:e9085. <https://doi.org/10.7717/peerj.9085>
- Marais A, Murolo S, Faure C, et al (2021) Sixty years from the first disease description, a novel badnavirus associated with chestnut mosaic disease. Phytopathology 111:1051–1058. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0420-R>
- Marinoni D, Akkak A, Bounous G, et al (2003) Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.). Mol Breeding 11:127–136. <https://doi.org/10.1023/A:1022456013692>



# Efficient monitoring of phenology in chestnuts

Clément LARUE<sup>a,b,\*</sup>, Teresa Barreneche<sup>c</sup>, Rémy J. Petit<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univ. Bordeaux, INRAE, BIOGECO, 33610 Cestas, France

<sup>b</sup>INVENIO, Maison Jeannette, 24140 Douville, France

<sup>c</sup>Univ. Bordeaux, INRAE, BFP, 33140 Villenave d'Ornon, France

Published in *Scientia Horticulturae* in 2021

## ABSTRACT

Chestnuts (*Castanea spp.*) are ecologically and economically important forest and fruit trees. They are cultivated for their nutritious nuts. To select varieties to be cultivated in chestnut orchards, their phenology needs to be considered. In this work, we adapt the international BBCH system to chestnuts by building on an existing phenological scale used in some European countries for these species. The proposed BBCH scale uses eight of the ten principal growth stages for fruit trees and secondary growth stages that are specific to chestnut trees. We tested it by monitoring chestnut trees phenology during three growing seasons, illustrating its suitability for high-throughput phenotyping studies. Overall, the approach used, despite its inherent limitations, is straightforward, accessible and flexible, allowing particularly precise description of the complex flowering phenology of these trees.

## KEYWORDS

BBCH, Flowering phenology, Pollination, Monoecious, Male-sterile, Fagaceae, Castanea

## INTRODUCTION

Plant phenology is the timing of plant life seasonal events, such as bud burst, flowering, fruiting, and leaf abscission. It plays a fundamental role in the functioning of both natural ecosystems and agrosystems (Stucky et al., 2018). Because plant phenology is influenced by climatic variables and affects plant growth and reproduction, it is key to studies of the consequences of climate change. In agriculture, plant phenology is also particularly useful for the planning of cultivation operations such as planting, fertilizing, irrigating or harvesting (Chmielewski, 2003) and for breeding programs (Meier et al., 2009). Therefore, phenological data are currently collected around the world at an accelerated pace. However, phenological descriptions are often not standardized, making it difficult to make sense of newly collected data in large-scale multispecies comparisons (Stucky et al., 2018). Hence, it is crucial to develop universal phenological scales for all major cultivated species.

The *Biologische Bundesanstalt, Bundesortenamt und Chemische Industrie* (BBCH) scale developed for monitoring phenological growth stages is the result of a teamwork conducted by the German Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, the German Federal Office of Plant Varieties, the German Agrochemical Association and the Institute for Vegetables and Ornamentals (Bleihölder et al., 1989). This work generated much interest, and Hack et al. (1992) subsequently published the principles of the extended BBCH, a universal scale that works with mono- and dicotyledons. Since 1992, new BBCH extended scales for specific crops have regularly been published, including some for fruit trees: pome fruits and stone fruits (Meier et al., 1994), *Citrus* (Agusti et al., 1995), apricots (Pérez Pastor et al., 2004), mango (Hernández Delgado et al., 2011), or sweet cherry (Fadón et al., 2015). Despite some limitations (Stucky et al., 2018), this method has many advantages for practical applications and has become a standard in agronomy.

There are seven consistently recognized chestnut tree

species growing in subtropical, Mediterranean and temperate forests from the Northern hemisphere (Pereira-Lorenzo et al., 2012). Some are of special economic importance. In particular, the Chinese chestnut (*C. mollissima*), Japanese chestnut (*C. crenata*) and European chestnut (*C. sativa*) are widely cultivated for their fruits (Pereira-Lorenzo et al., 2012). Chestnut production is mostly concentrated in Asia and Europe (Food and Agriculture of the United Nations, 2020). China is by far the main producer of chestnuts worldwide, with over 1.9 million tons of fruits harvested annually. Fruit production in China has tripled in the last two decades. In Europe, chestnut production, which had steadily decreased since the 19<sup>th</sup> century, has slowly started to recover since the 2010s, currently reaching about 0.15 million tons per year, thanks to a renewed interest of consumers for chestnut products.

Chestnut trees are self-incompatible (Stout, 1926; Xiong et al., 2019). Hence, orchards must include enough varieties for successful cross-fertilization. When female flowers of a variety are receptive, male flowers of nearby trees from different compatible varieties must release pollen at the same time for successful pollination, fertilization and fruit production (Solignat and Chapa, 1975). Because there is a wide variation in flowering phenology across varieties, a knowledge of that variation is essential for the design of productive orchards. Chestnut trees are monoecious and have a complex flowering phenology with two separate peaks of pollen emission (Stout, 1928; Hasegawa et al., 2017). To monitor chestnut phenology, it is therefore critical to develop an effective method taking into account these biological features.

Solignat and Chapa (1975) have proposed the first phenological scale for chestnuts growth stages. This system has been widely used by chestnut breeders and germplasm curators to screen and characterize chestnut cultivars phenology and for establishing plant variety rights in Europe using harmonized descriptions of new varieties fulfilling criteria of distinctness, uniformity and stability, as defined in Kiewiet (2005). Badeau et al. (2017) then proposed a very simplified BBCH scale for chestnut to be used in a citizen science program, in which they monitored only male flowers. Here we propose a complete phenology scoring system combining Solignat and Chapa (1975) stages and the international BBCH system to facilitate comparisons across studies thanks to a uniform coding system of phenologically equivalent growth stages in plants (Hack et al., 1992).

## MATERIALS AND METHODS

### Development of a BBCH scale

The BBCH scale is a decimal code (from 00 to 99) divided into principal and secondary growth stages. An arithmetically greater code always indicates a plant at a later growth stage (Meier et al., 2009). The first digit corresponds to the main growth stage common to all plants. It allows comparisons between different crops, including mono- and dicotyledons. These stages begin from stage 0: “Germination / sprouting / bud development” and end with stage 9: “Senescence, beginning of dormancy” (Hack et al., 1992). The second digit corresponds to secondary growth stages, i.e. short developmental stages characteristics of the studied plant species. These secondary growth stages, also coded from 0 to 9, can represent percentages or average developmental stages: for example, stage 5 could represent a plant with 50% of flowers open or a plant with a relatively high proportion of unfolded leaves (Meier, 2001). If two or more growth scales are used to describe separate phenological events proceeding in parallel, such as the phenology of male and female flowers in monoecious species, they are separated by a slash.

To develop a BBCH phenological scale for chestnut trees, we relied on the principal growth stages used for pome fruits and stone fruits by Meier et al. (1994). To further describe chestnut flower development, we identified secondary growth stages and assigned them specific scores. For this purpose, we selected as much as possible phenological scores matching with those proposed by Solignat and Chapa (1975).

### Chestnut flowering

Chestnut trees (genus *Castanea*) have a remarkably complex reproductive system. At the flower level, they are monoecious. Their small female and male flowers are borne on inflorescences called catkins. At the inflorescence level, however, chestnut trees are andromonoecious: they have two types of catkins, unisexual male catkins and bisexual catkins. Bisexual catkins are composed of a few female flowers generally grouped by three at the basis of the catkin. After pollination, they develop into an infrutescence composed of a spiny burr enclosing up to three fruits, one per flower. The distal part of bisexual catkins harbors numerous male flowers grouped into small glomerules spirally organized on the catkin. Finally, at the tree level, chestnut trees are either bisexual or unisexual female. In female trees, also called male-sterile trees, male catkins are still present, but their



*Figure 1: This flowering shoot is composed of eight unisexual male catkins (black symbols) and two bisexual catkins (white symbols) at the tip. The phenological score that we attributed to this tree on that particular day using the BBCH scale was 65/65/59. On that branch, seven unisexual catkins are at full bloom, whereas the most distal unisexual catkin is just starting to flower (overall BBCH score for unisexual catkins: 65). Each bisexual catkin has a single female inflorescence formed by three female flowers at full receptivity (BBCH = 65) and a short male catkin. Flowers of the male part of the bisexual catkins are still not open, but catkins are already well elongated (BBCH = 59).*

flowers have aborted anthers that produce little or no pollen. Interestingly, these male flowers still produce nectar and attract insects (Pereira-Lorenzo et al., 2017; Larue et al., in press).

The phenology of chestnuts is particularly complex. Male flowers of unisexual catkins bloom much earlier than male flowers of bisexual catkins, whereas female flowers have a long receptivity period. This rare flowering system (Renner, 2014), first described by Meehan (1879), is called duodichogamy (Stout, 1928). The two peaks of pollen emission do not overlap (Hasegawa et al., 2017) and are very unequal, the first one being an order of magnitude greater than the second one in terms of number of flowers produced and amount of pollen released (Larue et al., in press).

### Study site and monitoring

The studied trees belong to the INRAE chestnut genetic resources collection (Figure S1). They grow in two nearby orchards located near Bordeaux in southwestern France (44.788319 N, -0.577062 E). The

collection includes 117 *C. sativa*, 22 *C. crenata*, 20 *C. mollissima* and 81 interspecific hybrids, including 56 *C. sativa* x *C. crenata* hybrids, some of which belong to popular varieties widely cultivated in the region. All the 240 trees are grafted on two well-known rootstocks: 'Marsol' (CA07) or 'Maraval' (CA74). The first orchard was planted in 1970 and comprises 29 widely spaced trees on 2.3 ha. The second orchard was planted in 1990 and includes 211 trees on 3.5 ha.

In late spring of 2018, we monitored flowering phenology of all trees twice a week. In 2019 and 2020, we monitored a subset of these trees. We photographed phenological growth stages in the field with APS-C camera (Fujifilm X-T3 and Nikon D500) equipped with a macro lens objective (Fujinon XF 80 mm f/2.8 R LM OIS W Macro and AF-S VR Micro-Nikkor 105mm f/2.8G).



*Figure 2: Illustration of flowering stages. Left pictures: unisexual male catkins. a) 59: Male catkins just before flowering. Catkins have almost their final length and have turned yellow but their flowers grouped in well-differentiated glomerules are still closed. b) 65: Male catkins from male-sterile trees at full flowering. Flowers are open but stamens are not visible. c) 65: Male catkins from male-fertile trees at full flowering. Stamens are visible. d) 67: Male catkins are fading and turning brown. Central pictures: bisexual catkins. e) 59: Male part of bisexual catkins just before flowering. f) 65: Male part of bisexual catkins from male-sterile trees at full bloom. Flowers are open, aborted stamens have short filaments and do not protrude from the flowers. g) 65: Male part of bisexual catkins from male-fertile trees at full bloom. Flowers are open and stamens have long filaments. h) 67: Male part of a bisexual catkin that has turned brown. Right pictures: female inflorescence. i) 61: Only the stigmas of the central flower are visible. j) 63: Stigmas of central flower are well developed and stigmas of lateral flowers are visible. k) 65: full receptivity. Stigmas of the three flowers are well developed. l) 67: tips of stigmas from female flowers have turned brown.*

## RESULTS

The proposed BBCH phenological scale for chestnut trees includes eight principal growth stages (Table 1). We used three different scores to describe accurately

the whole complexity of flowering phenology in this andro-monoecious species. The first score is for male flowers from unisexual catkins. The second score is for female flowers from bisexual catkins. The third score is for male flowers from bisexual catkins. For example, at chestnut tree scored 65/65/59 (Figure 1)

corresponds to unisexual catkins with at least 50% of opened male flowers and to bisexual catkins with at least 50% of receptive female flowers and with all male flowers still unopened. Note that the scores used for the two types of male flowers are the same. We illustrate these flower developmental stages in Figure 2.

To assess the phenology of the male flowers from male-sterile trees, we relied on the proportion of open male flowers instead of estimating the proportion of flowers with conspicuous stamens emerging from the catkins (Table 1, Stage 5). To evaluate the phenology of female flowers, we propose two options. One option is to rely on the appearance of diagnostic stages, following Solignat and Chapa (1975) (Table 1, Stage 6, Female flowers option 1). Alternatively, a semi-quantitative scale can be used to describe tree receptivity, similar to that used for male flowering (Table 1, Stage 6; Female flowers option 2).

We successfully applied this new BBCH scale to the trees from INRAE chestnut genetic resources collection during three years. To briefly illustrate the type of results obtained, mean date, minimum date and maximum date for onset of full flowering of the two types of male catkins are provided in Table 2 for measures performed in 2018 on all trees, distinguishing the three pure species and one class of hybrids. On average, male flowers from bisexual catkins reach full bloom about 10 days after male flowers from unisexual catkins. Date of flowering of male catkins vary slightly among species but greatly within each species. Overall, for unisexual catkins, 25 days separate the earliest and the latest chestnut trees, whereas for bisexual catkins, 20 days separate the earliest and the latest trees.

To illustrate the dynamic of chestnut flowering, we provide an example of the flowering phenology of two trees from two different varieties in year 2018, illustrating the two peaks of male flowering in this duodichogamous species (Figure 3).

## DISCUSSION

In principle, to model accurately the phenology of a studied species, one should rely on a complete ontology of phenological traits to be measured exhaustively at the whole plant level (Stucky et al., 2018). However, this can quickly become time consuming. Diagnosing phenological stages using pre-established scores, as performed with the BBCH scale,

is much faster, making it possible to monitor many more trees. We chose that latter strategy to compare varieties in orchards.

We successfully tested this new BBCH scale on trees from three chestnut species and their hybrids. Given the great homogeneity of the genus, it is likely that other chestnut species, including the American chestnut (*C. dentata*), can be scored with the proposed system. Furthermore, the proposed chestnut BBCH scale is suitable for both male-fertile and male-sterile trees. On male flowers from male-fertile trees, the stamens are conspicuous and easily scored. For male-sterile trees, the aborted stamens do not emerge out of the flower so a closer look on the opening of male flowers themselves is required.

The scoring of the phenology of female flowers can be adapted to meet different objectives. A simple approach is to monitor what happens at the scale of inflorescences, allowing comparison with Solignat and Chapa (1975) phenological stages. Instead, if the objective is to study the temporal compatibility between pollen emission and female flower receptivity, we recommend evaluating the percentage of receptive female flowers using class intervals. To investigate in even more details the mating system of the species, a more rigorous but more labor-intensive approach is to monitor and track individually a sample of flowers on each tree, as performed by Hasegawa et al. (2017).

To the best of our knowledge, this study is the first to use phenological stages based on the BBCH scale in chestnut. Despite some limitations inherent in the approach used, this scale allows a rapid semi-quantitative assessment of the growth stages of the three types of flowers found in this tree, making it possible to gather precious phenological knowledge on all chestnut species worldwide.

## Acknowledgements

This paper is part of the PhD of CL. We thank Y. Mellerin, B. Dencausse and A. Ducouso for their invaluable assistance in scoring tree phenology. The study was possible thanks to the continuous support of INRAE experimental unit Vigne Bordeaux (UEVB) in Villenave d'Ornon and of X. Capdeville of UMR Biogeoco who are managing the experimental orchards used for this study. Comments from three reviewers helped improve this paper.

Tableau 1: Phenological growth stages of chestnuts according to the BBCH scale and conversion from Chapa and Solignat (1975) scale.

<b>BBCH Code</b>	<b>Description</b>	<b>Conversio n</b>
<b>Stage 0: Sprouting/Bud development</b>		
<b>0</b>	Dormant buds	A - Af
<b>07</b>	Beginning of bud break	B
<b>09</b>	Green leaf tips visible :First green leaf tips just visible	C
<b>Stage 1: Leaf development</b>		
<b>11</b>	First leaves unfolded	D
<b>15</b>	More leaves unfolded, not yet at full size	D
<b>19</b>	All leaves unfolded and fully expanded	Dl
<b>Stage 3: Shoot development</b>		
<b>31</b>	Beginning of shoot growth	
<b>35</b>	Shoots about 50% of final length	
<b>39</b>	Shoots about 90% of final length	
<b>Stage 5: Catkins growth (unisexual catkins / Female inflorescences / bisexual catkins)</b>		
<b><i>Male catkins (unisexual or bisexual)</i></b>		
<b>50</b>	Appearance of male catkins	Dm-Da
<b>55</b>	Glomerules are visible, male catkins grow	
<b>59</b>	Glomerules well differentiated, male catkins about 90% of final length	Em
<b><i>Female inflorescences</i></b>		
<b>50</b>	Appearance of buds of female inflorescences	Df
<b>55</b>	Buds of female inflorescences are visible, bisexual catkins grow	
<b>59</b>	Female inflorescences well differentiated, bisexual catkins about 90% of final length	Ef
<b>Stage 6: Flowering (Male flowers of unisexual catkins / Female flowers / Male flowers of bisexual catkins)</b>		
<b><i>Male flowers (unisexual or bisexual catkins)</i></b>		
<b>60</b>	First male flowers open	Fm-Fa
<b>61</b>	Beginning of the flowering: 10-20% of male flowers open	
<b>62</b>	20-30% of male flowers open	
<b>63</b>	30-40% of male flowers open	
<b>64</b>	40-50% of male flowers open	
<b>65</b>	Full flowering: at least 50% of male flowers open	Fm2-Fa2
<b>67</b>	Catkins fading: at least 50% of brown male catkins	Gm-Ga
<b>69</b>	End of flowering: at least 50% of male catkins have fallen	Hm

---

***Female flowers (Option 1): Phenotypic stages***

---

60	Female flowers visible	
61	Stigmas of the central flower of the inflorescence visible	Ff
63	Stigmas of the central flower elongated, stigmas of lateral flowers visible	
65	Full receptivity: stigmas of three female flowers are well developed	Ff2
67	At least 50% of female flowers have brown stigmas	
69	End of flowering: all female flowers have brown stigmas	

---

***Female flowers (Option 2): Receptivity***

---

61	Beginning of the flowering: 10-20% of female flowers are receptive	
62	20-30% of female flowers are receptive	
63	30-40% of female flowers are receptive	
64	40-50% of female flowers are receptive	
65	Full flowering: at least 50% of female flowers are receptive	
67	At least 50% of female flowers have brown stigmas	
69	End of flowering: all female flowers have brown stigmas	

---

**Stage 7: Burr development**

---

72	Involucre is 3x larger than when the female inflorescence was receptive	I
75	Burrs about 50% of final volume	J
79	Burrs about 90% of final volume	J

---

**Stage 8: Fruit maturity**

---

81	Burrs turn brown	K
83	First burrs open	Lo
85	At least 50% of burrs open	Mo
87	At least 50% of chestnuts/burrs fallen	N - O
89	All chestnuts/burrs fallen	N - O

---

**Stage 9: Leaf senescence**

---

90	Leaves begin to discolor or start to fall	Dj
91	About 10% of leaves discolored or fallen	Dz
95	About 50% of leaves discolored or fallen	Dz
97	All leaves fallen	Dz

---

## Funding

This work was supported by the ANRT funding under CIFRE PhD program to CL. Financial support to Invenio for this project was provided by the Regional Council of Nouvelle Aquitaine.

## Photo credits

Photography of Figure 1 and of the two insets of Figure 2 are by RJP, all others are by CL.

Tableau 2: Date in Julian days of onset of full flowering for male catkins in 2018 in the INRAE chestnut collection, according to chestnut species.

Type	N	Unisexual male catkins (BBCH = 65)	Male flowers of bisexual catkins (BBCH = 65)
<i>C. sativa</i>	11 7	163.8 (155.5-177)	173.7 (165.5-182)
<i>C. sativa x C. crenata</i>	56	161.3 (155.5-170)	172 (162-180)
<i>C. crenata</i>	22	160.2 (152-165.5)	169.9 (162-178.5)
<i>C. mollissima</i>	20	159.8 (155.5-170)	173.2 (170-177)

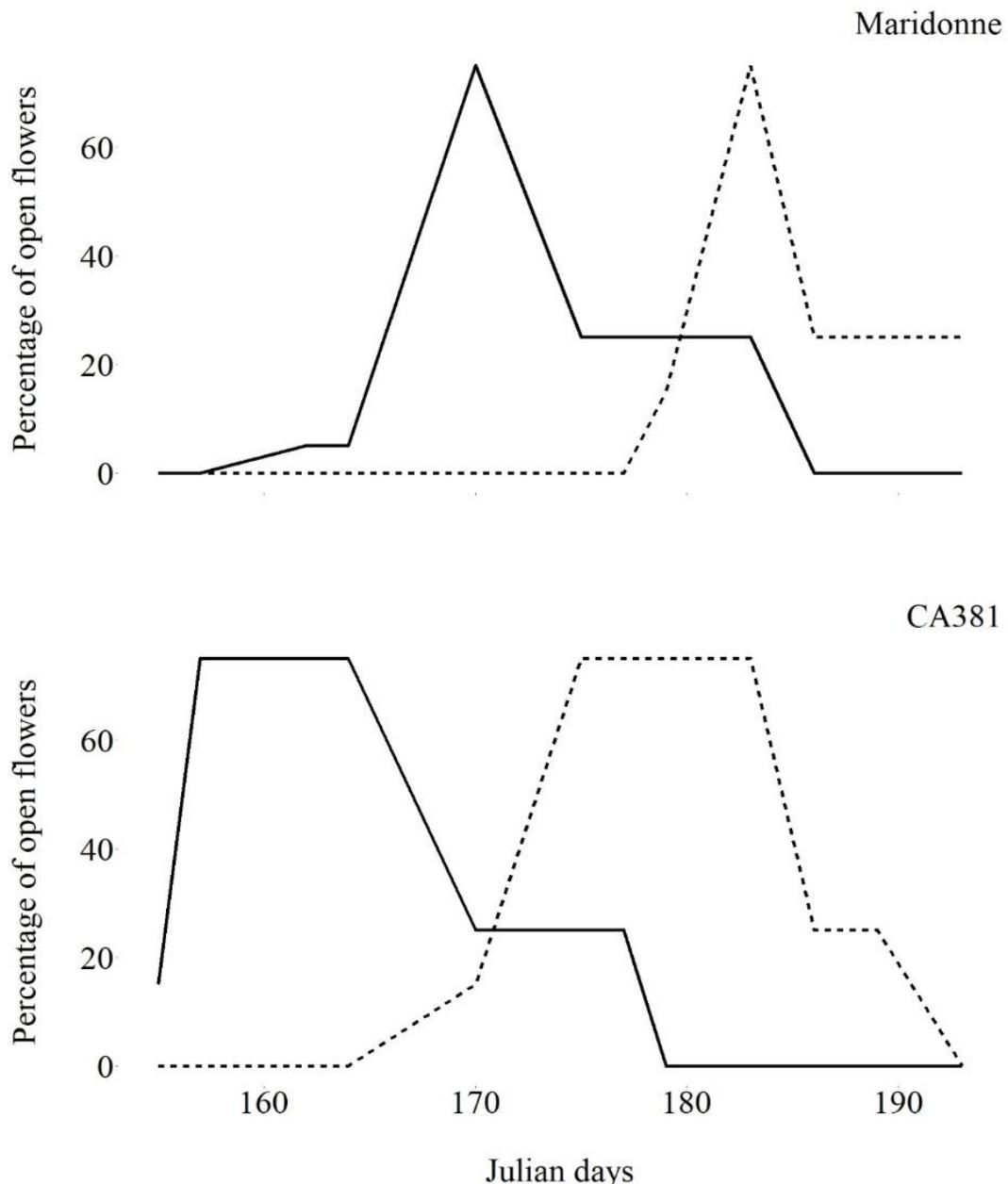


Figure 3: Male flowering phenology of two trees of the 'Maridonne' and CA381 varieties in year 2018. The x-axis is expressed in Julian days and the y-axis in percentage of open male flowers. Phenology of male flowers from unisexual catkins is represented by a continuous line and phenology of male flowers from bisexual catkins is represented by a dotted line. CA381 flowers two weeks earlier than Maridonne and its pollen emission lasts longer. Percentage of open flowers can be estimated from the BBCH scale, with the scores 60, 61, 62, 63, 64, 65 and 67 representing respectively roughly 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, 75% and 25% of open flowers

## REFERENCES

- Agustí, M., Zaragoza, H., Bleiholder, H., Buhr, L., Hack, H., Klose, R., Stauss, R., 1995. Escala BBCH para la descripción de los estadios fenológicos del desarrollo de los agrios (Gén. *Citrus*). Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos 189–199.
- Badeau, V., Bonhomme, M., Bonne, F., Carré, J., Cecchini, S., Chuine, I., Ducatillion, C., Jean, F., Lebourgeois, F., Seguin, B., Saisons, L. collectif scientifique de l'Observatoire D., 2017. Les plantes au rythme des saisons: guide d'observation phénologique. Biotope, Mèze.
- Bleiholder, H., Van Den Boom, J., Langelüddeke, P., Stauss, R., 1989. Einheitliche Codierung der phänologischen Stadien bei Kultur- und Schadpflanzen. Gesunde Pflanzen 41, 381–384.
- Chmielewski, F.-M., 2003. Phenology and Agriculture, in: Schwartz, M.D. (Ed.), Phenology: An Integrative Environmental Science, Tasks for Vegetation Science. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 505–522. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0632-3\\_31](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0632-3_31)
- Fadón, E., Herrero, M., Rodrigo, J., 2015. Flower development in sweet cherry framed in the BBCH scale. Sci. Hortic. 192, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.05.027>
- Food and Agriculture of the United Nations, 2020. FAOSTAT Statistical Database [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed 10.9.20).
- Hack, H., Bleiholder, H., Buhr, L., Meier, U., Schnock-Fricke, U., Weber, E., Witzenberger, A., 1992. Einheitliche Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen. - Erweiterte BBCH-Skala, Allgemein-. Nachr. Dtsch. Pflanzenschutzd. 44, 265–265.
- Hasegawa, Y., Suyama, Y., Seiwa, K., 2017. Flowering phenology of a duodichogamous self-incompatible tree species, *Castanea crenata*. Jap. J. Ecol. 67, 31–39. [https://doi.org/10.18960/seitai.67.1\\_31](https://doi.org/10.18960/seitai.67.1_31)
- Hernández Delgado, P.M., Aranguren, M., Reig, C., Fernández Galván, D., Mesejo, C., Martínez Fuentes, A., Galán Saúco, V., Agustí, M., 2011. Phenological growth stages of mango (*Mangifera indica* L.) according to the BBCH scale. Sci. Hortic. 130, 536–540. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.027>
- Kiewiet, B., 2005. Plant variety protection in the European Community. World Pat. Inf. 27, 319–327.
- <https://doi.org/10.1016/j.wpi.2005.07.006>
- Meehan, T., 1879. On sex in *Castanea Americana*. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia 31, 165–167.
- Larue, C., Austruy, E., Basset, G., Petit, R.J., in press. Revisiting pollination mode in chestnut(*Castanea spp.*): an integrated approach. Bot. Lett. <https://doi.org/10.1080/23818107.2021.1872041>
- Meier, U. (Ed.), 2001. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants: BBCH Monograph. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry.
- Meier, U., 1997. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- Meier, U., Bleiholder, H., Buhr, L., Feller, C., Hack, H., Heß, M., Lancashire, P.D., Schnock, U., Stauß, R., Boom, T. van den, Weber, E., Zwerger, P., 2009. The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants – history and publications –. J. Kulturpflanzen 61, 41–52. <https://doi.org/10.5073/JfK.2009.02.01>
- Meier, U., Graf, H., Hack, H., Heß, M., Kennel, W., Klose, R., Mappes, D., Seipp, D., Stauß, R., Streif, J., Boom, T. van den, 1994. Phänologische Entwicklungsstadien des Kernobstes (*Malus domestica* Borkh. und *Pyrus communis* L.), des Steinobstes (*Prunus*-Arten), der Johannisbeere (*Ribes*-Arten) und der Erdbeere (*Fragaria x ananassa* Duch.). Nachr. Dtsch. Pflanzenschutzd. 46, 141–153.
- Pereira-Lorenzo, S., Ballester, A., Corredoira, E., Vieitez, A.M., Agnostonakis, S., Costa, R., Bounous, G., Botta, R., Beccaro, G.L., Kubisiak, T.L., Conedera, M., Krebs, P., Yamamoto, T., Sawamura, Y., Takada, N., Gomes-Laranjo, J., Ramos-Cabrér, A.M., 2012. Chestnut, in: Badenes, M.L., Byrne, D.H. (Eds.), Fruit Breeding, Handbook of Plant Breeding. Springer US, Boston, MA, pp. 729–769. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9_19)
- Pereira-Lorenzo, S., Costa, R., Agnostonakis, S., Serdar, U., Yamamoto, T., Saito, T., Ramos-Cabrér, A.M., Ling, Q., Barreneche, T., Robin, C., Botta, R., Contessa, C., Conedera, M., Martín, L.M., Martín, A., Gomes-Laranjo, J., Villani, F., Carlson, J.E., 2017. Interspecific hybridization of chestnut, in: Polyploidy and Hybridization for Crop Improvement. CRC Press, pp. 377–407.
- Pérez-Pastor, A., Ruiz-Sánchez, M.C., Domingo, R., Torrecillas, A., 2004. Growth and phenological stages of Búlida apricot trees in South-East Spain. Agronomie 24, 93–100.

<https://doi.org/10.1051/agro:2004004>

Renner, S.S., 2014. The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. *Am. J. Bot.* 101, 1588–1596.

<https://doi.org/10.3732/ajb.1400196>

Solignat, G., Chapa, J., 1975. Biologie florale du châtaignier, in: Châtaignes et marrons. Invuflec.

Stout, A.B., 1926. Why are chestnuts self-fruitless? *J. New York Bot. Gard.* 27, 154–158.

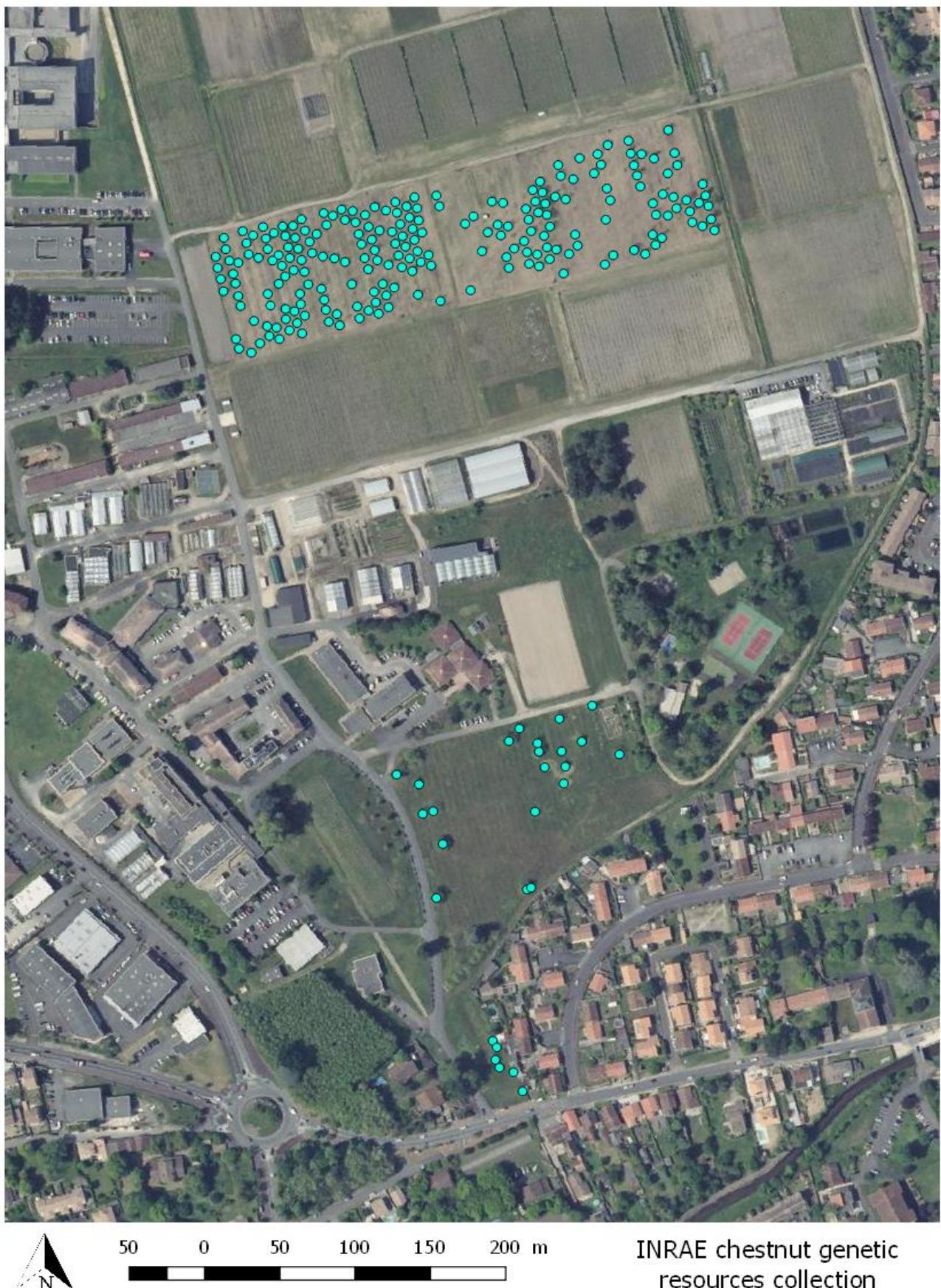
Stout, A.B., 1928. Dichogamy in flowering plants. *Bull.*

Torrey Bot. Club 55, 141–153.

<https://doi.org/10.2307/2480605>

Stucky, B.J., Guralnick, R., Deck, J., Denny, E.G., Bolmgren, K., Walls, R., 2018. The plant phenology ontology: a new informatics resource for large-scale integration of plant phenology data. *Front. Plant Sci.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00517>

Xiong, H., Zou, F., Guo, S., Yuan, D., Niu, G., 2019. Self-sterility may be due to prezygotic late-acting self-incompatibility and early-acting inbreeding depression in Chinese chestnut. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 144, 172–181. <https://doi.org/10.21273/JASHS04634-1>



Supplementary Figure S1: Map of all chestnuts from INRAE genetic resources collection.



# Development of highly validated SNP markers for genetic analyses of chestnut species

Clément Larue<sup>a,b,\*</sup>, Erwan Guichoux<sup>a</sup>, Benoît Laurent<sup>a</sup>, Teresa Barreneche<sup>c</sup>, Cécile Robin<sup>a</sup>, Marie Massot<sup>a</sup>, Adline Delcamp<sup>a</sup>, Rémy J. Petit<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univ. Bordeaux, INRAE, BIOGECO, 33610 Cestas, France

<sup>b</sup>INVENIO, Maison Jeannette, 24140 Douville, France

<sup>c</sup>Univ. Bordeaux, BFP, 33140 Villenave d'Ornon, France

Published in *Conservation Genetic Resources* in 2021

## ABSTRACT

To better study and manage chestnut trees and species, we identified nuclear single nucleotide polymorphism (SNP) markers using restriction-associated DNA sequencing. Out of 343 loci tested, 68 SNP markers were selected that withhold stringent quality criteria such as quasi-systematic amplification across species and Mendelian segregation in both purebred and hybrid individuals. They provide sufficient power for species, hybrids and backcross characterization as well as for clonal identification, as shown by a comparison with single sequenced repeat (SSR) loci.

## MANUSCRIPT

Chestnuts are self-incompatible and insect-pollinated Fagaceae trees from the Northern hemisphere (Stout 1926; Xiong et al. 2019; Barreneche et al. 2019; Larue et al. 2021a, b). Three species are widely cultivated for their nutritious nuts, the Japanese (*Castanea crenata*), Chinese (*C. mollissima*) and European (*C. sativa*) chestnuts (Barreneche et al. 2019). *C. sativa* is very vulnerable to ink disease and chestnut blight caused by pathogenic agents originating from Asia (Gonthier and Robin 2019). Hybrids between Asiatic species and *C. sativa* proved resistant to ink disease and were selected for cultivation in Europe. Genetic markers could help differentiate chestnut species, hybrids and other introgressed material as well as varieties, thereby facilitating the management of orchards. Such markers could also clarify the status of natural chestnut stands threatened by the propagation of diseases and by genetic pollution. A number of molecular markers have been previously developed in chestnuts, especially SSRs (e.g. Buck et al. 2003; Marinoni et al. 2003; Durand et al. 2010; Laurent et al. 2020) and were then widely used (e.g. Barreneche et al. 2004; Casasoli et al. 2006; Bodénès et al. 2012; Fernández-Cruz and

Fernández-López 2012; Mattioni et al. 2013; Pereira-Lorenzo et al. 2017, 2020; Bouffartigue et al. 2020; Nishio et al. 2021). However, SNPs have some important advantages over SSRs (Guichoux et al. 2011). First, genotyping errors are much rarer with SNPs than with SSRs, facilitating standardisation across laboratories. Second, SNP genotyping platforms make it possible to quickly characterize and score a large number of samples at reduced costs. Although SNPs have already been developed in chestnuts (Santos et al. 2017; Nishio et al. 2018; Nunziata et al. 2020; Sun et al. 2020), no SNP assays have been designed and optimized for the mentioned applications.

We identified SNPs in the nuclear genome of chestnuts using restriction-site associated DNA sequencing (Miller et al. 2007). We used three samples from the INRAE chestnut germplasm collection, one *C. mollissima* (Ca 737), one *C. crenata* (Ca 04) and one *C. sativa* (Ca 577). We also included SNPs originating from *C. mollissima* CCall\_Unigene\_V2 assembly data and from *C. dentata* AC454\_Unigene\_V3 contig data (Santos et al. 2017; <http://www.hardwoodgenomics.org/>).

Table 1: Allele frequencies of the 79 polymorphic SNPs

Name	Chromosome <sup>1</sup>	Position	Alleles <sup>2</sup>	<i>crenata</i>	<i>mollissima</i>	<i>sativa</i>	<i>s x c</i>
10090_56	03	66.9	A/G	0.714	0.235	0.863	0.500
10271_144	02	66.6	A/G	1.000	1.000	0.325	0.735
1156_97	08	19.8	G/A	1.000	1.000	0.438	0.676
11811_126	03	51.0	A/T	1.000	0.559	1.000	1.000
12533_73	07	21.4	G/A	1.000	1.000	0.154	0.618
13102_76	11	0.8	G/A	1.000	1.000	0.400	0.588
14353_126	12	12.6	G/A	0.786	1.000	0.150	0.500
14391_73	09	9.4	A/T	0.214	0.971	1.000	0.706
14608_73	01	48.7	T/G	1.000	1.000	0.175	0.588
1473_122	09	6.1	G/A	0.643	1.000	1.000	0.824
14743_107	05	54.0	T/C	0.429	0.000	1.000	0.824
15233_98	11	26.1	C/G	1.000	1.000	0.263	0.588
16018_58	07	10.9	T/C	1.000	0.441	0.150	0.618
16460_134	04	18.7	A/T	1.000	1.000	0.564	0.824
17159_26	02	37.7	A/G	1.000	1.000	0.550	0.735
177_149	08	44.3	C/A	1.000	1.000	0.825	0.912
18967_46	07	49.6	T/C	1.000	0.912	0.775	0.941
2219_98	02	62.4	G/A	1.000	1.000	0.788	0.882
22561_111	02	76.3	G/A	0.571	1.000	1.000	0.794
23240_125	12	3.5	A/T	1.000	0.382	1.000	1.000
24122_43	01	13.1	A/G	0.214	0.912	1.000	0.559
24959_44	06	14.9	C/T	1.000	1.000	0.488	0.588
262_54	05	13.4	C/T	0.714	0.559	0.925	0.735
26669_93	07	26.5	A/C	0.786	1.000	1.000	0.912
26674_123	01	69.0	C/T	1.000	1.000	0.638	0.912
27408_32	08	32.6	C/T	1.000	1.000	0.313	0.618
28714_26	02	17.6	G/A	1.000	0.735	1.000	1.000
30876_169	07	29.8	T/C	0.286	1.000	1.000	0.588
3239_136	04	26.7	A/G	0.643	1.000	1.000	0.794
3252_33	08	37.1	C/T	0.643	1.000	1.000	0.706
33254_153	04	31.4	C/T	1.000	1.000	0.738	0.912
36048_114	01	69.5	C/T	1.000	1.000	0.250	0.618
37241_49	10	13.9	A/T	0.643	1.000	1.000	0.824
3876_115	/	/	T/C	1.000	0.559	1.000	1.000
38812_93	10	19.5	A/C	1.000	1.000	0.200	0.588
39014_71	04	45.7	A/G	0.786	1.000	1.000	0.676
4137_29571	07	19.4	C/G	1.000	0.000	0.650	0.853
4285_31	05	24.3	C/G	1.000	1.000	0.538	0.882
435_64	12	37.7	C/G	1.000	1.000	0.775	0.941
4856_83	12	15.6	C/T	1.000	0.529	1.000	1.000
6083_144	02	66.6	A/G	1.000	1.000	0.325	0.735
6207_157	01	76.4	G/C	0.786	1.000	1.000	0.706
6505_48	01	73.9	T/A	0.500	1.000	1.000	0.676

Name	Chromosome <sup>1</sup>	Position	Alleles <sup>2</sup>	<i>crenata</i>	<i>mollissima</i>	<i>sativa</i>	<i>s x c</i>
6519_41_95_2	04	40.6	G/A	0.714	0.471	1.000	0.853
6803_119	07	10.9	C/T	0.857	0.441	1.000	0.647
774_155	04	20.2	A/T	1.000	1.000	0.838	0.941
8143_154	08	10.9	C/G	0.571	1.000	1.000	0.824
8363_141	07	9.7	G/A	1.000	1.000	0.138	0.676
AC_32934_470	02	71.7	C/T	0.429	0.824	0.950	0.529
AC_39247_1551	05	49.6	T/C	1.000	1.000	0.550	0.824
b1_SNP_higher_path_12837	02	52.8	G/A	0.429	1.000	0.363	0.412
b1_SNP_higher_path_18882	02	21.2	A/C	1.000	1.000	0.438	0.706
b1_SNP_higher_path_5736	04	7.1	G/A	0.929	0.853	0.625	0.706
CC_22194_867	12	41.6	G/A	1.000	0.618	0.838	0.971
CC_23658_1308	11	42.8	G/A	1.000	0.794	0.750	0.912
CC_34458_544	04	36.2	G/A	1.000	0.529	0.738	0.941
CC_4168_418	01	39.3	C/T	0.714	0.941	0.000	0.471
CC_45599_593	02	78.3	T/C	0.857	0.294	1.000	0.971
CC_46354_1005	/	/	C/T	1.000	0.529	0.713	0.824
CC_47186_942	04	7.7	G/A	1.000	0.147	0.625	0.941
SNP_10570_98_A_T	07	31.8	T/A	0.500	0.000	0.863	0.735
SNP_11428_101_A_G	05	27.6	G/A	1.000	0.000	0.525	0.882
SNP_12453_74_G_A	11	0.8	G/A	1.000	1.000	0.400	0.588
SNP_15209_73_A_G	12	38.5	A/G	1.000	1.000	0.500	0.706
SNP_15252_70_A_G	01	66.2	A/G	1.000	1.000	0.325	0.588
SNP_17902_74_C_T	06	40.6	C/T	1.000	1.000	0.588	0.735
SNP_7453_81_A_T	04	14.1	A/T	0.429	0.735	1.000	0.853
SNP_higher_path_9439722	06	5.3	G/A	1.000	1.000	0.650	0.794

<sup>1</sup> Location on the 12 chromosomes of the reference genome of *C. mollissima*.

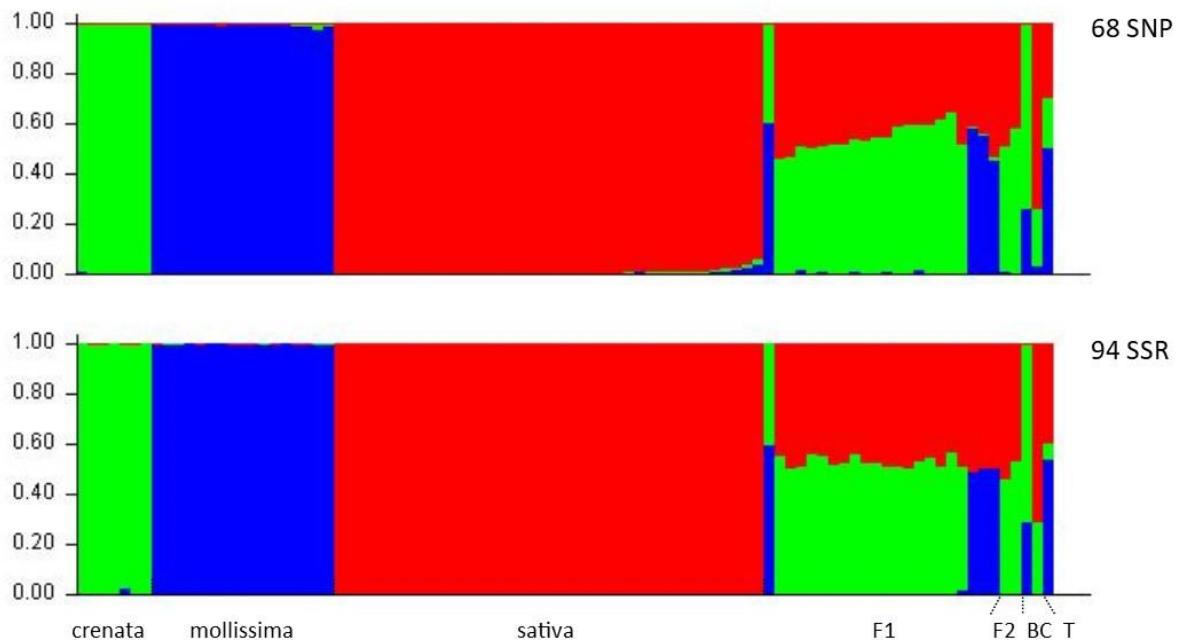
<sup>2</sup>The two alleles of each SNP are indicated and the frequency of the first allele (the most abundant in the overall sample) is provided for the three chestnut species and for the *C. sativa* x *C. crenata* (*s x c*) hybrids.

We first tested the markers on a set of 95 samples including the three sequenced parents, the offspring of two interspecific crosses (Ca 577 × Ca 737 and Ca 577 × Ca 04) and nine French cultivars. Their DNA was isolated from leaves dried in silica gel with Qiagen DNeasy 96 Plant kit. We further checked the markers on another set of 95 unique genotypes from the INRAE chestnut germplasm collection, which includes the three chestnut species and several F1, F2 and advanced hybrids. Their DNA was isolated from frozen leaves with a CTAB DNA isolation protocol (Supplementary 1) adapted from Doyle and Doyle (1987).

We selected 343 candidate SNPs, including 37 loci from Santos et al. (2017) and 306 loci originating from a restriction-associated DNA sequencing experiment (García et al. 2018). These loci were successfully

sequenced in all three parents, were heterozygous in at least one of them, and lacked variation within at least 50 bp around the SNP position. We designed nine MassARRAY multiplexes (Assay Design Suite v2.0, Agena Bioscience, San Diego, USA) of up to 40 loci. Data analysis relied on MassARRAY Typer Analyzer 4.0.26.75 (Agena Biosciences). We excluded all monomorphic SNPs, loci with weak or ambiguous signal (i.e., displaying more than three genotypes clusters or with unclear cluster delimitation) and loci with >10% missing data. Out of the 343 loci tested, 237 were validated (Larue 2021, File 1).

We then combined the best markers in two new multiplexes of 40 and 39 loci (Larue 2021, File 2) and used them to genotype the second set of 95 individuals. All 79 loci were polymorphic. Extensive testing with MISMATCHFINDER (<https://github.com>



*Figure 1: Comparison of species assignment for 91 chestnut trees characterized with 68 SNPs (top) and 94 SSRs (bottom). Results are very similar even though the admixture values of hybrids and other crosses are closer to the expected proportions with SSRs than with SNPs, except for the three-way hybrid (T).*

[/jschoete/mismatchfinder](#), Supplementary 2) of over 3000 progeny identified 68 markers segregating according to Mendelian expectations that worked well on all species. The mean amplification rate was 99.9% (97.8-100%) per SNP locus and 99.9% (98.7-100%) per sample. By contrast, the mean amplification rate was 92.2% (76.9-100%) per SSR locus and 91.7% (41.5-100%) per sample (Laurent et al. 2020).

These markers are listed in Table 1, and 66 of the 68 SNPs are located on the chromosome assembly of *C. mollissima* genome (Sun et al. 2020). Table 1 also includes allelic frequencies for the three chestnut species and for *C. sativa* x *C. crenata* hybrids, computed using GENALEX 6.51 (Peakall and Smouse 2012).

To evaluate the utility of these markers for species and hybrid identification, we used the Bayesian clustering analysis software STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) and compared the results with those obtained with SSRs (Laurent et al. 2020). A total of 91 unique genotypes were characterized with both types of markers and used for the comparison (Larue 2021, Files 3 and 4; Supplementary 3). Three clear-cut genetic clusters were identified with both markers, matching well with the known identity of the trees and confirming the taxonomic utility of these SNPs (Figure 1). We also computed the probability of identity for the 68 SNPs and the 94 SSRs (Supplementary 4). For

the SNPs, they were all close to zero, showing that all chestnut genotypes can be easily differentiated with these markers. To conclude, the developed SNPs are suitable for identification of chestnut cultivars, species and hybrids. They should help manage production orchards and monitor the remaining wild chestnut stands.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Schoeters for developing MISMATCHFINDER software, C. Lalanne for DNA isolation protocol development and L. Dubois, C. Boury and C. Mouden for SNP identification and genotyping. We thank INRAE experimental unit Vigne Bordeaux (UEVB) in Villenave d'Ornon, and INRAE experimental unit Forêt Pierrotton (UEFP) for their continuous support for chestnut orchards management.

## FUNDING

This paper is part of the PhD of CL. The work was supported by ANRt funding under CIFRE PhD program to CL. Financial support to Invenio for this project was provided by the Conseil Régional d'Aquitaine for CL PhD work, as part of the REGINA project, and for BL work (Grant Number 2018-

1R20204 project DIGIE “chestnut dieback: vulnerability and genetic determinism of ink disease resistance”). SNP development and genotyping were performed at the Genome Transcriptome Facility of Bordeaux (grants from the Conseil Régional d’Aquitaine no. 20030304002FA and 20040305003FA, from the European Union FEDER no. 2003227 and from Investissements d’Avenir ANR-10-EQPX-16-01).

## DATA AVAILABILITY

All data are available on Data INRAE:

Larue C (2021) Development of SNP markers for the identification of chestnut species, hybrids and varieties. <https://doi.org/10.15454/XEMDLD>

## AUTHOR CONTRIBUTION

Clément Larue: Conceptualization, Investigation, Resources, Formal analysis, Writing – original draft

Erwan Guichoux: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing

Benoît Laurent: Formal analysis, Writing – review & editing

Teresa Barreneche: Conceptualization, Funding acquisition, Writing – review & editing

Cécile Robin: Conceptualization, Funding acquisition, Writing - review & editing

Marie Massot: Investigation, Resources, Writing – review & editing

Adline Delcamp: Investigation, Resources, Writing – review & editing

Rémy J. Petit: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing

## REFERENCES

Barreneche T, Botta R, Robin C (2019) Advances in breeding of chestnuts. In: Achieving sustainable cultivation of tree nuts, Burleigh Dodds Science Publishing Limited, Cambridge (UK). Burleigh Dodds Science Publishing, pp 317–348

Barreneche T, Casasoli M, Russell K, et al. (2004) Comparative mapping between *Quercus* and *Castanea* using simple-sequence repeats (SSRs). *Theor Appl Genet* 108:558–566. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1462-2>

Bodénès C, Chancerel E, Gailing O, et al. (2012) Comparative mapping in the Fagaceae and beyond with EST-SSRs. *BMC Plant Biol* 12:153. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-153>

Bouffartigue C, Debille S, Fabreguettes O, et al. (2020) Two main genetic clusters with high admixture between forest and cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in France. *Ann For Sci* 77:74. <https://doi.org/10.1007/s13595-020-00982-w>

Buck EJ, Hadonou M, James CJ, et al. (2003) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Mol Ecol Notes* 3:239–241. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00410.x>

Casasoli M, Derory J, Morera-Dutrey C, et al. (2006) Comparison of Quantitative Trait Loci for Adaptive Traits Between Oak and Chestnut Based on an Expressed Sequence Tag Consensus Map. *Genetics* 172:533–546.

<https://doi.org/10.1534/genetics.105.048439>

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15

Durand J, Bodénès C, Chancerel E, et al. (2010) A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. *BMC Genomics* 11:570. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-570>

Fernández-Cruz J, Fernández-López J (2012) Morphological, molecular and statistical tools to identify *Castanea* species and their hybrids. *Conserv Genet* 13:1589–1600.

<https://doi.org/10.1007/s10592-012-0408-0>

García C, Guichoux E, Hampe A (2018) A comparative analysis between SNPs and SSRs to investigate genetic variation in a juniper species (*Juniperus phoenicea* ssp. *turbinata*). *Tree Genet Genomes* 14:87. <https://doi.org/10.1007/s11295-018-1301-x>

Gonthier P, Robin C (2019) Diseases. In: The chestnut handbook: crop and forest management. CRC Press

Guichoux E, Lagache L, Wagner S, et al. (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecol Resour* 11:591–611. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>

Larue C (2021) Development of SNP markers for the identification of chestnut species, hybrids and varieties. <https://doi.org/10.15454/XEMDLD>

Larue C, Austruy E, Basset G, Petit RJ (2021a) Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea*

- spp.): an integrated approach. *Bot Lett* 0:1–25. <https://doi.org/10.1080/23818107.2021.1872041>
- Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021b) Efficient monitoring of phenology in chestnuts. *Sci Hortic* 281:109958. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109958>
- Laurent B, Larue C, Chancerel E, et al. (2020) Microhaplotype genotyping-by-sequencing of 98 highly polymorphic markers in three chestnut tree species. *Conservation Genet Resour*. <https://doi.org/10.1007/s12686-020-01157-5>
- Marinoni D, Akkak A, Bounous G, et al. (2003) Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.). *Mol Breed* 11:127–136. <https://doi.org/10.1023/A:1022456013692>
- Mattioni C, Martin MA, Pollegioni P, et al. (2013) Microsatellite markers reveal a strong geographical structure in European populations of *Castanea sativa* (Fagaceae): Evidence for multiple glacial refugia. *Am J Bot* 100:951–961. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200194>
- Miller MR, Dunham JP, Amores A, et al. (2007) Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Res* 17:240–248. <https://doi.org/10.1101/gr.5681207>
- Nishio S, Takada N, Terakami S, et al. (2021) Genetic structure analysis of cultivated and wild chestnut populations reveals gene flow from cultivars to natural stands. *Sci Rep* 11:240. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80696-1>
- Nishio S, Takada N, Terakami S, et al. (2019) Estimation of effective pollen dispersal distance for cross-pollination in chestnut orchards by microsatellite-based paternity analyses. *Sci Hortic* 250:89–93. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.037>
- Nunziata A, Ruggieri V, Petriccione M, De Masi L (2020) Single Nucleotide Polymorphisms as Practical Molecular Tools to Support European Chestnut Agrobiodiversity Management. *Int J Mol Sci* 21:4805. <https://doi.org/10.3390/ijms21134805>
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pereira-Lorenzo S, Bischofberger Y, Conedera M, et al. (2020) Reservoir of the European chestnut diversity in Switzerland. *Biodivers Conserv* 29:2217–2234. <https://doi.org/10.1007/s10531-020-01970-2>
- Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM, Barreneche T, et al. (2017) Database of European chestnut cultivars and definition of a core collection using simple sequence repeats. *Tree Genet Genomes* 13:114. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1197-x>
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959
- Santos C, Nelson CD, Zhebentyayeva T, et al. (2017) First interspecific genetic linkage map for *Castanea sativa* x *Castanea crenata* revealed QTLs for resistance to *Phytophthora cinnamomi*. *PLOS ONE* 12:e0184381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184381>
- Stout AB (1926) Why are chestnuts self-fruitless? *Journ N Y Bot Gard* 27:154–158
- Sun Y, Lu Z, Zhu X, Ma H (2020) Genomic basis of homoploid hybrid speciation within chestnut trees. *Nat Commun* 11:3375. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17111-w>
- Xiong H, Zou F, Guo S, et al. (2019) Self-sterility may be due to prezygotic late-acting self-incompatibility and early-acting inbreeding depression in Chinese chestnut. *J Am Soc Hortic Sci* 144:172–181. <https://doi.org/10.21273/JASHS04634-18>

# An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction

Clément LARUE<sup>a,b</sup> (\*), Teresa BARRENECHE<sup>c</sup>, Rémy J PETIT<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univ. Bordeaux, INRAE, BIOGECO, 33610 Cestas, France

<sup>b</sup> INVENIO, Maison Jeannette, 24140 Douville, France

<sup>c</sup> Univ. Bordeaux, INRAE, BFP, 33140 Villenave d'Ornon, France

Published in *Annals of Forest Sciences* in 2021

## KEY MESSAGE

Pollination is a key step for fruit production. To provide a tool for future in depth analysis of pollination in chestnut, we describe in details a chestnut orchard (location, genotype, phenotype and seed-set of all trees)

**Context:** Chestnuts, which are insect-pollinated trees, have been massively planted around the world for nut production. Orchards are planted with clonal varieties selected from crosses between the European chestnuts (*Castanea sativa*) and Japanese chestnuts (*C. crenata*) or Chinese chestnuts (*C. mollissima*) because these two last species are tolerant to blight and ink diseases.

**Aims:** To characterize chestnut genetic resources and accurately model male and female fitness as well as pollen exchanges in orchards, we characterized all chestnuts of the INRAE chestnut germplasm collection located near Bordeaux (France). Methods: All chestnut trees were geolocated and genotyped using 79 SNP and 98 SSR loci. We scored their flowering phenology using chestnut BBCH scale and precisely described their phenotype (height, diameter at breast height (DBH), canopy diameter...), their capacity to produce pollen (flower type, catkins length...) and their fruit production (number of burrs, seed-set...).

**Results:** We geolocated 275 trees and genotyped 273 of them. We identified 115 unique genotypes and assigned each genotype to species. To assess phenology, we evaluated 244 trees twice a week, during six weeks from early June to mid-July. We also described tree phenotypes with 11 variables, pollen production with 5 variables and fruit production with 3 variables. All measures were recorded in 2018 except seed set that was measured two consecutive years, in 2018 and 2019.

**Conclusion:** The data collected is very detailed and allows modelling precisely pollen exchanges between trees. Parts of this data have been successfully published in scientific articles.

Data are available at: <https://data.inrae.fr/dataset.xhtml?persistentId=doi:10.15454/GSJSWW>

Associated metadata are available at: <https://metadata-afs.nancy.inra.fr/geonetwork/srv/fre/catalog.search#/metadata/02c5ca07-1536-4f89-9a0c-9e8d44a91287>

## KEYWORDS

Fagaceae - *Castanea* sp. - Genotype - SNP - Species assignation - Varietal identification - Phenotype - Flower types - Staminate - Astamine - Male sterility

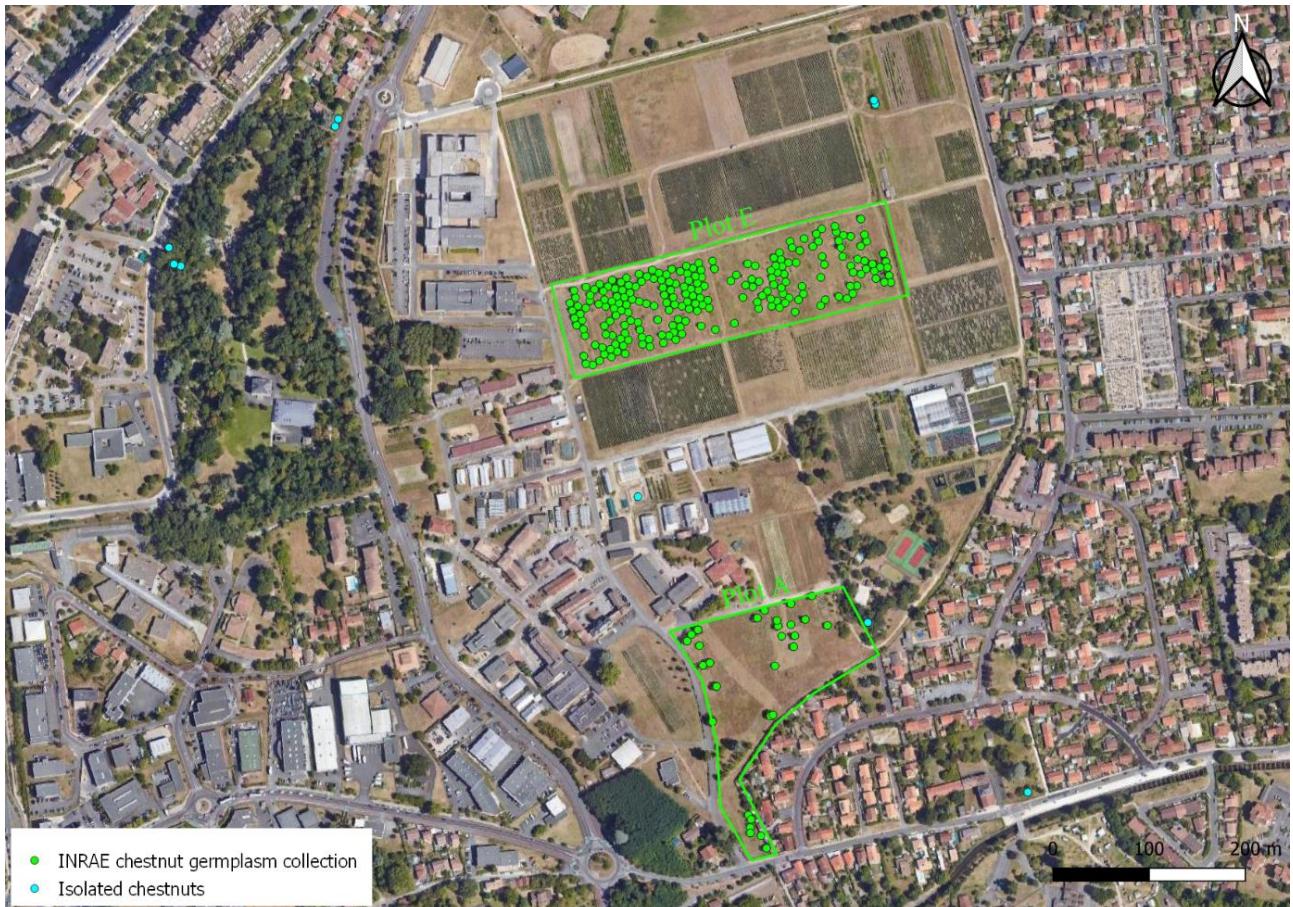


Figure 1: Map of INRAE chestnut genetic collection and of all isolated chestnuts found within a radius of 1km around the collection.

## BACKGROUND

The INRAE chestnut germplasm collection is located in Villenave d'Ornon near Bordeaux (Gironde, France). This collection consists of two experimental plots called “A” and “E” composed of respectively 29 and 215 chestnut trees from three species: the European chestnut (*Castanea sativa*), the Japanese chestnut (*Castanea crenata*), and the Chinese chestnut (*Castanea mollissima*), as well as their hybrids. We characterized the chestnut trees from these study plots, other chestnut trees planted across the INRAE experimental station, and all remaining chestnut trees found within a radius of 1km around the chestnut collection (Figure 1). We genotyped all these trees with SNP markers, identified 113 genotypes (“Multilocus matches” function from GenAlEx, Peakall and Smouse 2012) and assigned them to chestnut species (STRUCTURE analysis, Pritchard et al. 2000; Larue et al. 2021b). We further described the architecture, male catkins and fruit production of all trees in 2018, and repeated seed set measurements in 2019.

## METHODS

### Identification and geolocation of chestnut trees

We identified 275 chestnuts and geolocated them with a Garmin 64st. Tree positions were verified and corrected using QGIS Software (Qgis Desktop 3.16.4) with satellite photos from IGN BdOrtho. Tree coordinates are expressed in Lambert 93. Each tree received a unique identifier according to its position and this ID is used as reference across all files. There is an introduction register of INRAE chestnut germplasm established since 1950, but for this paper, with some few exceptions for illustration purposes, no attempt was made to systematically use common names for the varieties.

### Genotyping

Leaves were sampled from all identified trees and stored at -20°C until analysis. DNA isolation was performed with a CTAB custom protocol (Larue et al. 2021b). Samples were characterized using 120 Single



*Figure 2: Bisexual catkins from a male-sterile tree (astamine): General view (a) and close-up view (b). Most stamens are aborted and do not protrude from male flowers. Bisexual catkins from male-fertile tree (stamine): General view (c) and close-up view (d). Stamens have long filaments and are clearly visible.*

Nucleotide Polymorphism markers (SNPs) using Agena MassARRAY Platform (Larue et al. 2021b). We identified all samples having the same multilocus genotype using “Multilocus Matches” function from Genalex 6.503 (Peakall and Smouse 2021) and carefully inspected the results manually. We also computed “Multilocus near matches” to verify that different genotypes differ at multiple markers.

When the unique multilocus genotypes were identified (the genets), we obtained the consensus genotypes by summarizing genotypic data from all ramets of each genet. Finally, we used STRUCTURE software (Pritchard et al. 2000) to assign each ramet to species, as explained in Larue et al. (2021b).

## Phenotyping

The architecture of each ramet was described using the diameter at breast height (at 1.3m) for all stems >1cm, total height and canopy average diameter (in metre).

We then calculated the basal surface area (in square metre). We measured the density of male flowers of unisexual catkins (number of flowers per square metre) to estimate the capacity of each ramet to produce pollen. We identified flower type (Figure 2) according to Solignat and Chapa (1975), measured catkins length (in centimetre) and diameter (in millimetre), and estimated relative stamen density. The phenology of all trees was recorded twice a week in late spring of 2018 (from June to mid-July) using a specifically developed standardized scale (Larue et al. 2021c). Briefly, at each visit, each tree receives three scores, one for male flowers of unisexual male catkins, one for female flowers and one for male flowers of bisexual catkins. We estimated burr production (burr number per square metre) in July by counting the number of burrs in the canopy or on the ground underneath each tree. Finally, we collected burrs in the fall and estimated seed set by counting the number of developed nuts per burr (female inflorescences of chestnut trees are composed of three female flowers

located side by side). Each flower, if pollinated, produces a fruit surrounded by the pericarp; if pollination fails, the pericarp is still present but remains empty. If the three flowers of an inflorescence are not pollinated, the burr contains three empty nuts.

## ACCESS TO THE DATA & METADATA DESCRIPTION

Data is available at:

<https://data.inrae.fr/dataset.xhtml?persistentId=doi:10.15454/GSJSWW>

Associated metadata are described in a template called “**AFS\_Template\_Larue2021-metadata.xlsx**”, and are available at: <https://metadata.afs.nancy.inra.fr/geonetwork/srv/fre/catalog.search#/metadata/02c5ca07-1536-4f89-9a0c-9e8d44a91287>

It can be cited as:

Larue, Clement, 2021, "Intensive study site: INRAE chestnut germplasm collection (Domaine de la Grande Ferrade, Villenave d'Ornon)", <https://doi.org/10.15454/GSJSWW>, Portail Data INRAE, V9, UNF:6:ukulwpHEBuz9kZIrsE8SIQ== [fileUNF]

This dataset is composed of 17 Excel files: 1 file describing all variables entitled “**0\_0\_Read\_Me.xlsx**” and 16 data files, described below:

We labelled and mapped all chestnut trees located inside and outside the INRAE plantations:

**1\_1\_List\_Chestnuts.xlsx** contains a unique identifier for each chestnut tree.

**1\_2\_List\_INRAE\_Chestnuts\_Germplasm\_Collection.xlsx** is a list of all chestnut trees that are part of the two plantations, making-up the INRAE germplasm collection (excluding isolated trees that were not planted as part of this germplasm collection).

We genotyped all these chestnut trees at SNP markers:

**2\_1\_Genotypes.xlsx** is the corresponding raw data.

**2\_2\_Genotypes\_Genalex\_Input.xlsx** includes the SNP genotypes in Genalex format.

We identified trees having the same multilocus genotype (clones):

**3\_1\_Clonal\_identification.xlsx**

We compiled a list of all unique multilocus genotypes (the genets):

### 4\_1\_Consensus\_genotypes\_Genets.xlsx

We then attributed a genet to each ramet (several ramets of the same genet are grafted on different rootstocks).

### 5\_1\_Genotypes\_Ramets.xlsx

Using a Bayesian approach (Structure), we assigned each genet to the different gene pools corresponding to different chestnut species.

### 6\_1\_Species\_Identification\_Genets.xlsx

Finally, we described the phenotype of all chestnut trees in the intensive study plot:

**7\_1\_Chestnuts\_Phenotypes.xlsx** is a description of the architecture of the trees.

**7\_2\_Male\_Catkins.xlsx** includes a description of the male catkins of the trees.

**7\_3\_Phenology.xlsx** We scored the phenology of the trees during spring 2018.

**7\_4\_Chestnuts\_Production\_Estimates.xlsx** We estimated burr production of the trees during summer 2018.

**7\_5\_Seed\_Set\_2018.xlsx** We recorded seed set of the trees in fall 2018.

**7\_6\_Seed\_Set\_2019.xlsx** We also recorded seed set of the trees in fall 2019.

We listed 275 chestnut trees: 244 adult trees in the INRAE germplasm collection (A plot = 29 trees / E plot = 215 trees), 24 small trees in the nursery, and 7 adult trees outside INRAE campus. All trees are geolocated, but all the young trees of the nursery are represented by a single GPS point. Of the 275 trees identified, two died before collecting leaves for DNA isolation, so we have the genotypes of 273 individuals. We identified 113 unique genotypes (genet), with an average of 2,4 ramets/genet. All this information is summarized in:

### 8\_1\_Summary.xlsx

All chestnuts are located on a map:

### 8\_2\_Map.xlsx

## TECHNICAL VALIDATION

We validated the dataset first by hand and then using numerical and graphical analyses with R software (R software v4.0.4). Laboratory and measure equipment were regularly calibrated, and standards were used for each analysis. Genotyping errors with SNPs using

MassArray platform are extremely rare (Guichoux et al. 2011, Larue et al. 2021b), and it is therefore possible to quickly and reliably characterize a large number of samples at low cost. The genetic characterization of this collection is a first step for the creation of a database to describe chestnut cultivars. Users will be able to genotype their samples with the same markers (or a subset of them) and compare their results with the database.

## REUSE POTENTIAL AND LIMITS

The reuse of the data presented here is simple. The Excel files can be easily imported into R by saving them as .txt or .csv files with minor modifications. Parts of the data were used successfully in previous studies, demonstrating their usefulness and portability. For instance, we successfully performed STRUCTURE analyses (Pritchard et al. 2000) with 68 SNPs and 94 SSRs (Larue et al. 2021b), showing that the SNP markers are very reliable to identify clones, species and interspecific hybrids, including advanced hybrids.

The collected phenology data are also very detailed, allowing inter-varietal and interspecific comparisons, as performed in Larue et al. (2021c). In Larue et al. (2021a), we describe in details the phenology of two ramets for each of eight genets. We show that whereas the phenology of the different genets can vary greatly, it is very repeatable among ramets of the same genet. Seed set measurements also provide valuable data that allow us to highlight differences in probability of fecundation according to the flower types. In particular, we have shown that astaminate trees have a higher see-set than staminate tree (results not shown).

A limitation of the present work is that we have not attempted to provide common names for all accessions studied. This would require a lot of curation, which is under way. Indeed, by genotyping the chestnut collection, we have highlighted problems of varietal identification. In some cases, a single genet has been designated with several cultivar names, a case of synonymy. In other cases, different genets have received the same cultivar name, a case of homonymy. At this point, trees are therefore named only according to their position in the plot.

In the literature, male catkins are classified in four categories according to the length of stamen filaments: astaminate (no stamens emerging from the flowers), brachystaminate (stamens 1-3mm), mesostaminate (stamens 3-5mm) and longistaminate (stamens >5mm), with pollen production of the tree strongly depending on flower type. However, variation of pollen production across trees is a continuous trait and

these categories have limits.

Note also that when we calculated the seed set, we measured the number of fruits per burr, i.e. the number of flowers in each female inflorescence that give a fruit, but not burr set, i.e. the percentage of female inflorescences that give burrs. The probability of fecundity is therefore overestimated. To better estimate pollination success, it would be necessary to measure both burr set and seed set, which would be very labor-intensive.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Y. Mellerin (trees mapping and phenotyping), B. Dencausse (trees phenotyping), C. Helou-Bagaté (seed set measurements), C. Lalanne (seed set measurements and sample preparation), J. Dudit and M. Martin-Clotte (sample preparation) for their invaluable assistance. We thank X. Capdevielle and INRAE experimental unit Vigne Bordeaux (UEVB) in Villenave d'Ornon for managing of the experimental orchards. SNP development and genotyping were performed at the Genome Transcriptome Facility of Bordeaux (PGTB) with the help of E. Guichoux, M. Massot, A. Delcamp, C. Boury and L. Dubois.

## FUNDING

This paper is part of the PhD of CL. This work was supported by ANR funding under CIFRE PhD program to CL. Financial support to Invenio for this project was provided by the Conseil Régional d'Aquitaine for CL PhD work, and as part of the REGINA project to RJP. The PGTB facility where part of the work was conducted benefits from grants from the Conseil Régional d'Aquitaine no. 20030304002FA and 20040305003FA, from the European Union FEDER no. 2003227 and from Investissements d'Avenir (ANR-10-EQPX-16-01).

## CONTRIBUTION OF ALL CO-AUTHORS

Clément Larue: Conceptualization, Investigation, Resources, Formal analysis, Writing – original draft

Teresa Barreneche: Conceptualization, Writing – review & editing

Rémy J. Petit: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing

## REFERENCES

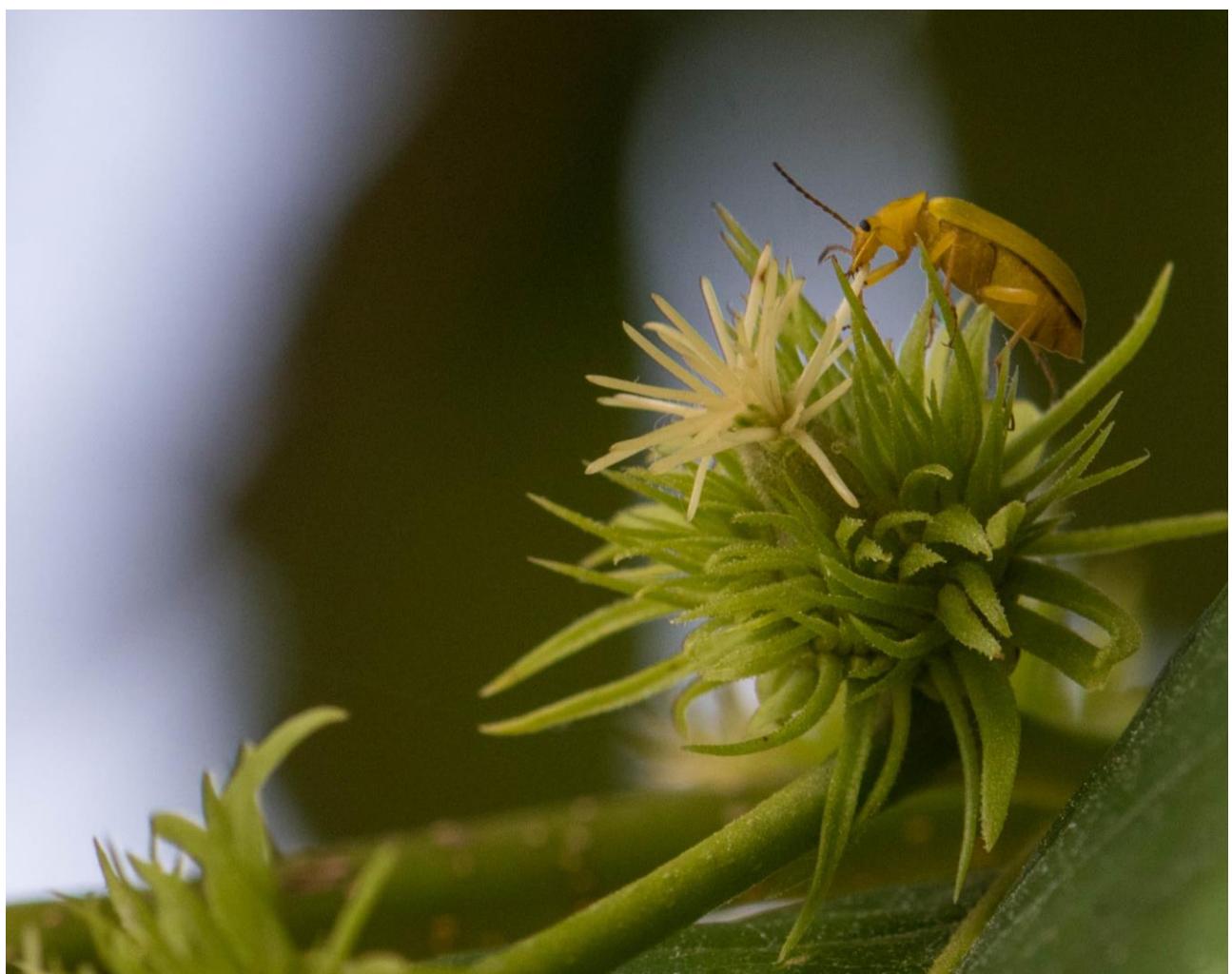
- Barreneche T, Botta R, Robin C (2019) Advances in breeding of chestnuts. In: Achieving sustainable cultivation of tree nuts, Burleigh Dodds Science Publishing Limited, Cambridge (UK). Burleigh Dodds Science Publishing, pp 317–348
- Chybicki IJ, Oleksa A, Dering M (2021) Identification of determinants of pollen donor fecundity using the hierarchical neighborhood model. Mol Ecol Resour 21:781–800. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13307>
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, et al. (2011) Current trends in microsatellite genotyping. Mol Ecol Resour 11:591–611. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>
- Klein EK, Carpentier FH, Oddou-Muratorio S (2011) Estimating the variance of male fecundity from genotypes of progeny arrays: evaluation of the Bayesian forward approach: Estimating male fecundity and pollen dispersal. Methods in Ecology and Evolution 2:349–361.  
<https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00085.x>
- Klein EK, Desassis N, Oddou-Muratorio S (2008) Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. IV. Whole interindividual variance of male fecundity estimated jointly with the dispersal kernel. Molecular Ecology 17:3323–3336.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03809.x>
- Larue C (2021) Intensive study site: INRAE chestnut germplasm collection (Domaine de la Grande Ferrade, Villenave d'Ornon),  
<https://doi.org/10.1545/GSJSWW>, Portail Data INRAE, V9, UNF:6:ukulwpHEBuz9kZIrsE8SIQ== [fileUNF]
- Larue C, Austruy E, Basset G, Petit RJ (2021a) Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea* spp.): an integrated approach. Botany Letters 0:1–25. <https://doi.org/10.1080/23818107.2021.1872041>
- Larue C, Guichoux E, Laurent B, et al. (2021b) Development of highly validated SNP markers for genetics analyses of chestnut species. Conservation Genetics Resources. In Press.
- Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021c) Efficient monitoring of phenology in chestnuts. Scientia Horticulturae 281:109958.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109958>
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. Bioinformatics 28:2537–2539.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945–959
- Solignat G, Chapa J (1975) Biologie florale du châtaignier. In: Châtaignes et marrons. Invuflec

## Chapitre 2

---

La pollinisation du châtaignier par les insectes







# Préambule

Mai 2018, Villenave d'Ornon.

*Je rentre pour la première fois dans le verger de la Grande Ferrade, tous les arbres sont en fleurs. Wow, ça sent fort ! Difficile de croire que des insectes ne sont pas impliqués dans la pollinisation du châtaignier...*

*Clément*

Lors de l'écriture du sujet de cette thèse, après les premières recherches bibliographiques, nous avions dressé ce constat :

- Tout d'abord, nous avons lu à de nombreuses reprises dans la littérature spécialisée à destination des professionnels que le châtaignier est anémophile, c'est à dire pollinisé par le vent, ou éventuellement ambophile, c'est-à-dire pollinisé surtout par le vent et un peu par les insectes : dans les régions sèches le vent serait le principal vecteur, alors que dans les milieux humides, les insectes jouraient un rôle plus important, car le pollen « volerait mal » (Solignat et Chapa 1975, Breisch 1995).
- Nous avons ensuite trouvé un premier très court article (de Oliveira et al. 2001) dans lequel les auteurs testaient expérimentalement le rôle des insectes dans la pollinisation du châtaignier en utilisant des filets anti-insectes : la production de fruits de fleurs femelles enfermées sous les filets est comparée à la production de fruits de fleurs témoins, laissées à l'air libre en pollinisation ouverte. La production de fruits s'effondre lorsque les insectes n'ont pas accès aux fleurs. La liste d'articles sur le sujet s'est depuis un peu allongée.
- Enfin, nous avons trouvé peu d'articles s'intéressant à la diversité des insectes visitant les fleurs du châtaignier, mais ces rares publications signalaient un résultat étonnant, potentiellement lourd de conséquences : les insectes visitent rarement les fleurs femelles (Hasegawa et al. 2015 ; Zirkle 2017), voire ne les visitent pas du tout (Giovanetti et Aronne 2011).

Le décor est planté. Dans ce second chapitre, je m'intéresse au(x) vecteur(s) du pollen de châtaignier et aux mécanismes de sa pollinisation. Il débute par un article intitulé « **Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea spp.*): an integrated approach** », publié dans *Botany Letters* (Larue et al. 2021) : nous y présentons dans un premier temps une expérience d'exclusion des insectes réalisée dans les vergers de châtaignier d'Invenio, et nous comparons ensuite les résultats obtenus à ceux des précédentes expériences du même type trouvées dans la littérature. Dans un second temps, nous identifions dans la collection INRAE de la Grande Ferrade, les insectes visitant les fleurs mâles et femelles des châtaigniers, en contrastant des châtaigniers mâle-fertiles (qui ne produisent pas ou peu de pollen) et des châtaigniers mâle-fertiles (produisant beaucoup de pollen). Et dans un troisième temps, après une revue des

syndromes de pollinisation anémophile et entomophile, nous décrivons le syndrome de pollinisation du châtaignier.

Nous avons répété en 2020 et 2021 l'expérience d'exclusion des insectes avec des filets de différentes tailles sur des arbres de la collection de châtaignier INRAE, et je présente ces nouveaux résultats dans un court article intitulé intitulé « **Le rôle crucial des insectes dans la pollinisation du châtaignier est confirmé** ».

Pour finir, je présente des résultats récemment acquis grâce aux travaux de deux stagiaires que j'ai pu co-encadrer : « **Evaluation du rôle des téléphores fauves mâles et femelles dans la pollinisation du châtaignier** » (Sarah Gentet, M2, 2021) et « **Quels sont les principaux polliniseurs du châtaignier ?** » (Grégoire Pauly, M1, 2021). Dans le premier, nous caractérisons les charges en pollen des téléphores fauves en utilisant des approches microscopiques et moléculaires. Dans le second, nous réalisons un nouveau suivi des insectes visiteurs durant la floraison du châtaignier, avec une attention particulière pour les visites aux fleurs femelles.

## REFERENCES

- Breisch H (1995) Châtaignes et Marrons. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, Paris, France
- de Oliveira D, Gomes A, Ilharco FA, et al (2001) Importance of insect pollinators for the production in the chestnut, *Castanea sativa*. Acta Hortic 269–273. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.561.40>
- Giovanetti M, Aronne G (2011) Honey bee interest in flowers with anemophilous characteristics: first notes on handling time and routine on *Fraxinus ornus* and *Castanea sativa*. B Insectol 64:77–82
- Hasegawa Y, Suyama Y, Seiwa K (2015) Variation in pollen-donor composition among pollinators in an entomophilous tree species, *Castanea crenata*, revealed by single-pollen genotyping. PLoS ONE 10:e0120393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120393>
- Larue C, Austruy E, Basset G, Petit RJ (2021) Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea* spp.): an integrated approach. Bot Lett 168:348–372. <https://doi.org/10.1080/23818107.2021.1872041>
- Solignat G, Chapa J (1975) La Biologie florale du Châtaignier. Institut National de Vulgarisation pour les Fruits Légumes et Champignons, Paris, France
- Zirkle C (2017) The effect of insects on seed set of ozark chinquapin, *Castanea ozarkensis*. Master Thesis, University of Arkansas

# Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea spp.*): an integrated approach

Clément Larue<sup>a,b</sup>, Eva Austruy<sup>a</sup>, Gaëlle Basset<sup>a</sup>, and Rémy J. Petit<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Univ. Bordeaux, INRAE, BIOGECO, 33610 Cestas, France

<sup>b</sup>INVENIO, Maison Jeannette, 24140 Douville, France

Published in *Botany Letters* in 2021

## ABSTRACT:

Wind, insects, or both? The pollination mode of chestnuts, an important genus of nut-producing forest trees of the Fagaceae family, is still unclear. We revisit this old question using an integrated approach, focusing on cultivated *Castanea sativa* trees and hybrids in South-western France. We first conducted a large-scale insect isolation experiment. We then monitored 16 trees, focusing on flowering phenology, flower abundance and insect visits. Half of these trees are male-sterile, helping explore the role of pollen in insect attraction. Finally, we characterized the pollination syndrome of chestnuts and contrasted it with that of wind-pollinated oaks using original and published data. Chestnut female flowers have erect styles resembling stamens from male flowers, a probable case of intersexual mimicry. The tree's unusual phenology includes two peaks of pollen production. Pollinator exclusion experiments demonstrated a predominant role of insects in chestnut pollination. Flowering trees attract large numbers of beetles, bees and flies. In contrast, the few insects seen on female flowers (66 in 32 h of observation, < 2% of the total) were mostly beetles. Compared to male-fertile trees, male-sterile trees attract fewer insects overall but their female flowers are more frequently visited and they have higher fruit set. All chestnut flower traits examined, such as the tiny pollen grains and the huge rate of pollen production, resulting in the highest pollen/ovule ratio ever reported in plants, are compatible with a beetle pollination syndrome. The high uncertainties of this pollination mode and its convergence with wind pollination explain the pervading confusion regarding chestnut pollination.

## KEYWORDS:

ambophily; automimicry; insect-pollination; phenology; pollen/ovule ratio; pollination syndrome; *Quercus*; wind-pollination

## INTRODUCTION

*The male flowers of the sweet chestnut were remarkably odiferous. A fair sized bunch in a room would give fragrance to a whole house. Where would be the use of adding this powerful odour to flowers in mere arrangements for cross-fertilization by the aid of winds?* Thomas Meehan, 1879.

To characterise accurately the pollination mode of a plant species, empirical observations and experimentations are essential. However, a focus on plants' "pollination syndrome" is also relevant, as illustrated by the above comment by Thomas Meehan.

Pollination syndromes are recurring suites of floral traits, caused by convergent evolution, that are witnessing the functional pollinator group or abiotic agent servicing the plant (Dellinger 2020). They allow valuable predictive generalizations in pollination ecology (Faegri and Van der Pijl 1979). The concept traces back to the Italian botanist Federico Delpino (1868–1874), who recognized that unrelated plants that share common pollinators often exhibit similar suites of floral traits. The eco-evolutionary principle underlying pollination syndrome is the "most effective pollinator principle" (Stebbins 1970). It posits that, since natural selection is a quantitative process, those pollinators that visit a plant most frequently and

effectively in a region should mould the characteristics of its flowers. This should favour correlations between traits, resulting in integrated syndromes. However, some traits can be difficult to interpret and mismatches between apparent pollination syndromes and current suite of pollinators exist, a decoupling that can help retrace recent pollinator shifts (Rosas-Guerrero et al. 2014). Pollination syndromes do not apply only to plants with specialized pollination systems (Stebbins, 1970). Yet the question of the existence and prevalence of generalist or mixed pollination strategies (such as ambiphily, i.e. adaptation to both wind and animal pollination) combining advantages of different strategies remains (Waser et al. 1996; Culley et al. 2002; Dellinger 2020; Timerman and Barrett 2020). When trade-offs exist between phenotypes that enhance the fitness contribution of one pollinator and phenotypes preferred by other pollination agents, optimization for generalized pollination is only possible when their joint contribution to global pollination fitness is greater than each individual contribution (Strelin et al. 2016). Hence, to interpret evolutionary changes in pollination-related traits, one should examine pollination syndromes with particular care, ideally by comparing related species differing in pollination mode.

Discussions on pollination syndromes often neglect abiotic agents of pollination, yet wind-pollinated species represent a fair share of plant species on Earth. At least 16,700 angiosperm species are wind-pollinated, i.e. 5.5 to 6.4% of the estimated species of angiosperms (Renner 2014). Distinguishing animal-from wind-pollinated plants is generally considered straightforward. For example, Hall and Walter (1991) argue that “*the divide between wind and animal pollination seems relatively robust, given the specialist adaptations [...] required for wind pollination to be effective*”. Similarly, Friedman and Barrett (2009) explain that “*the traits associated with wind pollination [...] are well established and tend to be less variable, and perhaps for this reason the notion of a ‘wind pollination syndrome’ has not attracted much scepticism*”. One of the features most frequently associated with wind-pollinated species is that they invest heavily in pollen production, as wind pollination is an “*inherently wasteful process as the chances of pollination are meagre*” (Mangla and Gupta 2015).

Nevertheless, difficulties to distinguish wind from insect pollination exist. For instance, in the past, palms were considered to be mainly wind pollinated and to form the functional counterparts of dicotyledon catkin bearers (Delpino 1868-1874). Their inflorescence and the small size, plethoric production and particular morphology of their pollen grains supposedly fitted with a wind pollination syndrome. However, a revised

assessment showed that palms are predominantly entomophilous and that two groups of pollinating beetles are closely associated with them (Henderson 1986). Similarly, field studies that have quantified airborne loads of *Cycas* pollen have all concluded that wind pollination could be effective in these plants. Yet Hall and Walter (2018) have shown that “*Cycas species are poorly adapted for wind pollination in ways that imply that insects have been the primary pollinators of these plants over a long evolutionary history*”. These examples question the longstanding belief that wind- and animal-pollination syndromes are easy to tell apart. In fact, for Sargent and Otto (2004), “*forcing the data into the false dichotomy of biotic pollination [...] versus abiotic pollination may have obscured the true patterns. For example, selection by beetle pollinators may be as different from that of bee pollinators as they both are from abiotic pollination*.”

Like palms and cycads, chestnuts (genus *Castanea*, Fagaceae) illustrate the difficulties to interpret plant traits in terms of evidence for one pollination vector over another. Both Sprengel (1811) and Delpino (1868-1874) suggested that chestnuts are wind-pollinated. Later, Groom (1909) argued that the showy, erect, scented male catkins and the numerous insect visitors point towards insect-pollination. Nevertheless, he considered that the inconspicuous and odourless female flowers, lacking reward for insect visitors, and bearing styles agreeing in size and position with the large stigmas of wind-pollinated flowers, suggest wind could also be involved. In one of the most complete investigation on chestnut pollination to date, Porsch (1950) summarized the attributes of this tree suggesting an entomophilous or anemophilous strategy. The former include the presence of nectar and nectaries, the stickiness of pollen, and the tiny size of the stigmas, as well as the frequent visits by beetles to flowering chestnuts. The latter include the massive production of male flowers, their somewhat reduced fragrance, the pollen that eventually becomes less sticky, as well as the lack of attractive power of female flowers. He concludes that chestnut exemplifies a case of ancient beetle-pollinated tree evolving towards wind-pollination, a stage already reached by some of its relatives, such as oaks and beeches. Subsequent investigations included various attempts to determine experimentally the pollination mode of chestnuts. In particular, in the USA, Clapper (1954) relied on emasculation and pollinator exclusion experiments and arrived at the strong but premature conclusion that chestnuts are largely wind pollinated. This work had much influence on subsequent studies. For instance, in Italy, Manino et al. (1991) observed many insects on chestnut flowers, more than half of which were honeybees (*Apis mellifera*), and performed experiments that showed a major role of insects in

pollination. Nevertheless, they merely conclude that “*the action of insects may be considered useful above all in years when the climate does not favor an effective wind pollination*”. Abrol (2015), summarizing the state of knowledge on chestnut pollination for fruit production purposes, insists, despite limited evidence, that most insects except honeybees do not occur in greater frequency during chestnut flowering than noted in other wind-pollinated plants. He recommends to establish honeybee-colonies in chestnut orchards and to include a sufficient proportion of well-distributed pollenizer trees for effective pollen dispersal by wind. Clearly, there is a need to re-evaluate chestnut pollination.

Chestnuts are particularly interesting models to investigate pollination. Chestnut species are monoecious, thereby facilitating the evaluation of pollinators’ efficiency by determining those that visit not only male but also female flowers. Monoecy also allows exploring if rewardless female flowers will evolve to mimic rewarding male flowers to attract pollinators (Willson and Ågren, 1989). Second, the presence in this tree of both male-sterile and male-fertile individuals (Pereira-Lorenzo and Ramos-Cabrer 2004) is ideal to test the role of pollen in insect attractiveness. Third, chestnuts have a complex flowering phenology, named duodichogamy, where each plant produces two batches of male flowers and a batch of female flowers that are temporally separated, an attribute shared by only a handful of species (Stout 1928; Renner 2014). This feature could help clarify pollination mechanism. Finally, the existence of closely related and well-investigated wind-pollinated congeners, the oaks, is a nice opportunity to study the evolution of pollination modes.

Our objective in this paper is to re-examine the pollination mode of chestnut. This knowledge is key to better design and manage chestnut orchards, to evaluate ecological services provided by natural or semi-natural chestnut ecosystems, and to investigate the evolution of reproductive traits in Fagaceae. It should also help revisit pollination syndromes of species producing abundant wind-dispersed pollen. For this purpose, we use an integrated approach including an experimental set-up (classical pollinator exclusion experiments) and observations of insect visitors. We then focus on the role of pollen and of flowering phenology in insect attraction. Furthermore, we clarify if visits to female flowers are taking place and why. Finally, we make a new attempt to characterize the pollination syndrome of chestnuts by comparing it with that of wind-pollinated oaks.

## MATERIAL AND METHODS

### Study species

Chestnuts belong to the Fagaceae family, which includes about 1000 species that dominate subtropical, Mediterranean and temperate forests of the Northern hemisphere. The Fagaceae family includes wind-pollinated tree species such as oaks *Quercus* spp. and beeches *Fagus* spp., and insect-pollinated ones, such as stone-oaks *Lithocarpus* spp., tanoaks *Notholithocarpus* spp. and Asian chinkapins *Castanopsis* spp. (Manos et al. 2001, 2008). With only seven species, the chestnut genus (*Castanea*) is among the smallest of the family. However, it encompasses economically and ecologically significant tree species, such as (i) the American chestnut *C. dentata*, an iconic tree of the eastern part of North America that was devastated by the chestnut blight in the first half of the 20<sup>th</sup> century; (ii) the blight resistant Chinese chestnut *C. mollissima*, an understory tree cultivated in East Asia for millennia for its nuts and currently the most widely cultivated chestnut worldwide; and (iii) the Japanese chestnut *C. crenata*, an important tree in Japan and elsewhere for its heavy production of sweet, edible nuts (Pereira-Lorenzo et al. 2012). All chestnut species have the same number of chromosomes, are self-incompatible and readily hybridize (Pereira-Lorenzo et al. 2019). According to Manos et al. (2001), the uniqueness of chestnuts lies in their female flowers, which always have six or more styles, compared to three in the other Fagaceae. The genus *Castanea* is closely related to *Castanopsis*. Both are sister to *Notholithocarpus* and to *Quercus*, the only purely wind-pollinated species in this clade (Oh and Manos 2008). A comparison of the pollination syndrome of chestnuts with that of the well-investigated oaks (genus *Quercus*) appears therefore particularly relevant.

The sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is the only native European chestnut species and an important multipurpose tree in the Mediterranean region. Used for its wood, fruit, honey, and tannin, it has played a major role in rural development. It still shapes the landscapes of several hilly Mediterranean regions in Italy, France, Portugal, Spain or Switzerland, covering an area of over 2.5 million hectares (Conedera et al. 2016). Named in France “*arbre à pain*” (Pitte, 2014), it has been used for thousands of years for its nuts. Its domestication, based on grafting of trees selected in the field, is still ongoing (Pereira-Lorenzo et al. 2019). This has resulted in an intermingling of wild and domestic gene pools, to the point that it has become extremely difficult to trace its natural distribution (Conedera et al. 2004).



*Figure 1: Difference between male-fertile and male-sterile trees during flowering. This male-sterile tree received a graft from a male-fertile tree. The male-fertile genotype has long conspicuous catkins (right part of the canopy). The male-sterile genotype has less conspicuous green catkins (left part of the canopy).*

Chestnuts are mass-flowering trees (Figure 1) with small flowers grouped in inflorescences named catkins. At the flower level, chestnuts are monoecious. Instead, at the inflorescence level, chestnuts are andromonoecious. At the tree-level, the widespread occurrence of male-sterile and male-fertile trees (called respectively astamine and longistamine) along with trees with intermediate male fertility (Pereira-Lorenzo et al. 2016) suggest that *C. sativa* is gynodioecious (Figure 2). Crossing and chloroplast sequencing studies have demonstrated a cytoplasmic origin for this male sterility (Sisco et al. 2014). The male flowers of male-sterile trees have aborted anthers but still produce nectar, thereby remaining attractive to insects.

The female flowers of chestnuts are remarkable. They are grouped by three, each having 6–8 styles with tiny, crater-like wet stigmas at their tips. The number of styles matches with the number of locules in the ovary, each locule having its own conducting tissue and hosting two ovules (Feijo et al. 1999; Shi and Stösser 2005). Hence, there are about 12–16 ovules per ovary

even if only one embryo is typically formed in a nut. Secretory cells layer the aperture of the stigma at full receptivity, which peaks several days after the onset of flowering (Nienstedt 1956; Feijo et al. 1999). The receptivity period of each stigma is restricted to about two days, corresponding to the presence of a mucilaginous secretion. Only one style at a time becomes receptive, greatly increasing the overall receptivity period of the female flower (Feijo et al. 1999).

According to Cannon (2001), in the related stone oaks (*Lithocarpus*), the “*successful pollination of the female flowers is a mystery as they provide little attraction to pollinators. During many hours of observation, I recorded a single visit by a potential pollinator to a female spike, which appeared to be accidental*”. The pollination of chestnut female flowers remains equally mysterious. For Johnson (1988), who studied the pollination mode of *C. pumila* in the southeastern United States, “*diurnal and nocturnal observations failed to detect [insects] on pistillate flowers*”. Giovanetti and Aronne (2011) tracked 23 honeybees visiting chestnut trees in an Italian orchard and



*Figure 2: Difference between male-fertile and male-sterile trees (details). a) Bisexual catkin, with a female inflorescence (the future burr) at the basis and a fertile male inflorescence at the distal end of the catkin. b) Honeybee (*Apis mellifera*) collecting pollen on a male-fertile catkin, with tiny anthers borne on long stamens. c) Couple of red soldier beetles (*Rhagonycha fulva*) on a male-sterile catkin, with brown, aborted anthers borne on short stamens that do not protrude from the flowers.*

recorded no visit to the female flowers. Zirkle (2017) surveyed both diurnal and nocturnal insects on *Castanea ozarkensis* and observed a single honeybee moving from a male catkin to a female flower of the same tree. Porsch (1950) argued that the tiny secretion produced by stigmas could represent a small reward for pollinating insects.

### Insect exclusion experiment

#### Study site

We conducted this experiment in the late spring of 2019 in the chestnut orchard of the INVENIO experimental station in Douville (45.019723 N, 0.614637 W). This orchard, where several honeybee colonies are established, comprises 12 ha of chestnut plantations surrounded by deciduous broadleaved forests dominated by wild chestnuts and by pine plantations.

#### Plant material

We selected six *C. sativa* × *C. crenata* hybrid varieties:



Figure 3: Insect-proof netting experiment. a) Nets on 8-years old trees. b) Nets on adult trees.

three male-fertile (staminate) varieties, Marigoule, Florifer and Maraval, and three male-sterile varieties, Bouche de Bétizac (hereinafter 'Bétizac'), Bellefer and OG19. These trees grow in two orchards located side by side. The first is composed of ca. 20 m-high adult trees belonging to Marigoule and Bétizac varieties, while the second is composed of 8-year-old, ca. 6 m-high trees belonging to the four other varieties.

## Experiment

To study the role of insects on chestnut pollination, we used two experimental groups. In the control group, open-pollinated flowers are accessible to both wind- and insect-transported pollen. In the treatment group, we enclosed all flowers in completely insect-proof polyester tulle nets with  $400\mu\text{m} \times 700\mu\text{m}$  openings (Diatex F550P; <https://www.diatex.com/fr/diatex-produit/f510/>). Hence, in the absence of apomixy (Shi

and Stösser 2005), only airborne pollen can fertilize female flowers. The young trees received one modality each, with five trees per variety and per modality. Ten branches per tree were equipped with nets for the caged modality (Figure 3a). The Marigoule variety was represented by eight adult trees and Bétizac by five adult trees. Each of these trees received ten replicates of both treatments, allowing a more precise comparison between treatments than for the young trees (Figure 3b). Altogether, we used 65 trees. The insect-proof nets were set-up in the spring before flowering. In the fall, we enclosed all burrs from both treatments in large nets to prevent fruit loss before evaluation of fruit set.

## Fruit set and pollination success

In *C. sativa* and its hybrids, the female inflorescences are typically composed of three female flowers. If



*Figure 4: Chestnut flowering shoot. There are two bisexual catkins at the tip, each with a single female inflorescence, and eight unisexual male catkins at the basis. We monitored the phenology of male unisexual catkins, of female inflorescences and of the male part of bisexual catkins. Note the large difference in the development of the two types of male catkins: whereas all but one unisexual catkins are in full bloom, the bisexual ones are still growing*

pollinated, each flower gives one nut typically including a single seed; otherwise, it gives an empty nut. Hence, to measure fruit set, we collected all the burrs in each treatment and counted the proportion of filled nuts. However, pollination success is the result of both fruit set (the average proportion of developed nuts per burr) and burr set (the proportion of inflorescences giving a burr). In our large-scale study, it was impractical to count the number of inflorescences before setting up the nets. Instead, we estimated the reduction in pollination success by dividing the total number of developed fruits in the treatment by the total number of burrs produced in the control. Overall, to estimate fruit set and pollination success, we examined the content of over 1600 burrs.

### Comparison with other insect exclusion experiments

We found mentions of five other pollinator exclusion experiments conducted on chestnuts, published in articles, conference reports or theses. In the USA, Clapper (1954) worked on Asian chestnuts species and hybrids, Johnson (1988) on *C. pumila* and Zirkle (2017) on *C. ozarkensis*, in Italy Manino *et al.* (1991)

investigated *C. sativa*, *C. crenata* and *C. sativa* × *C. crenata* hybrids, and in Portugal de Oliveira *et al.* (2001) focused on *C. sativa* and *C. sativa* × *C. crenata* hybrids. All studies except that of Zirkle (2017) were performed in plantations. We discarded Johnson's (1988) study because no data is provided by the author and Clapper's (1954) study because of the lack of repetitions and the questioning choice of control trees.

### Flowering and insect monitoring

#### Study site and plant material

We carried out the study in southwestern France (44.788319 N, -0.577062 E), in the INRAE chestnut genetic resources collection, which includes 237 trees belonging to *C. sativa*, *C. crenata*, *C. mollissima* and their hybrids. These trees grow in two nearby orchards. The first was planted in 1970 and comprises 29 widely spaced trees on 2.3 ha. In 2019, six honeybee colonies were present in this orchard. The second orchard was planted in 1990. It includes 211 trees on 3.5 ha. We selected 16 trees in these orchards for flowering and insect monitoring, half of which are *C. sativa* and half *C. sativa* × *C. crenata* hybrids. In each taxa, there were

four varieties, two male-fertile and two male-sterile ones, each represented by two ramets. The eight selected varieties were Marigoule (*C. sativa* × *C. crenata* hybrid, male-fertile), Maridonne (*C. sativa* × *C. crenata* hybrid, male-fertile), Bétizac (*C. sativa* × *C. crenata* hybrid, male-sterile), Marlzac (*C. sativa* × *C. crenata* hybrid, male-sterile), Despont n°3 (*C. sativa*, male-fertile), CA381 (*C. sativa*, male-fertile), Précoce des Vans (*C. sativa*, male-sterile), and Dauphine (*C. sativa*, male-sterile). The selected trees had easily accessible canopies to facilitate monitoring of visiting insects.

## Phenology monitoring

To study the flowering phenology of the 16 trees, we used the approach outlined in Larue et al. (2020). We monitored each tree twice a week throughout the flowering period immediately before surveying arthropod visitors. We assigned three scores: one for male flowers of unisexual catkins, one for female flowers and one for male flowers of bisexual catkins (Figure 4). To identify flower-visiting arthropods (see below), we defined the flowering period as the period starting with the blooming of the first male flowers of unisexual catkins and finishing with the wilting of the male flowers of the bisexual catkins.

## Flowering architecture of chestnut

To assess chestnut flowering architecture, we measured density and length of male catkins, density of female flowers, ratio of pollen-releasing and pollen-receptive reproductive surfaces, and relative importance of first and second peak of pollen emission. In spring 2020, we selected 10 branches per tree on each of the 16 trees monitored for insects in 2019. One of these trees did not produce any female flowers in 2020, so we replaced it by a clonal replicate from the same variety. On all these branches, we measured the branch section and counted the unisexual and bisexual catkins present on all annual shoot growth units. For bisexual catkins, we measured the length and diameter of the male catkin, the number and area (length × width) of female inflorescences (corresponding to three flowers each), and the distance between male and female inflorescence (herkogamy). We also cut five branches per tree. In the laboratory, we measured their section, the density of unisexual male catkins and their lengths. To estimate male flower density, we sampled four catkins per tree and for each of them counted all flowers on a 0.5 cm-long section under a binocular. For each parameter, we provide the mean, minimum and maximum values across all trees, unless otherwise specified.

The ratio of the number of pollen grains to the number of ovules in the flowers of a plant is an indicator of its

breeding system as it reflects the likelihood of sufficient pollen grains reaching each stigma. The more efficient the transfer of pollen, the lower the pollen/ovule ratio (Cruden 2000). To estimate this ratio in chestnut, we assumed that each ovary harbours an average of 12 ovules (Feijo et al. 1999). We then relied on our estimates of the proportion of each type of flowers for the eight male-fertile trees, as described in the previous paragraph, along with published data on number of stamens per male flower and of number of pollen grains per anther (Mert and Soylu, 2006). These authors studied four male-fertile chestnut cultivars and found a mean number of stamens per flower of 11.8 and an average of 4712 pollen grains per anther.

## Insect observations

We monitored arthropod visits on the 16 trees before, during and after chestnut tree flowering in June and July 2019. We relied on a non-destructive approach using macro-photography. We visited all 16 trees every 3 or 4 days during six weeks, inventorying all arthropods larger than 2 mm. The procedure was adapted from that used in the French citizen science program Spipoll (Deguines et al. 2012). One session on each tree lasted 20 min, during which we actively searched the accessible part of the canopy (< 2 m high) for insects and arachnids on flowers and leaves. During each session, we counted each arthropod making contact with the tree and photographed at least one individual of each taxon observed with an APS-C camera (Nikon D500, Nikon D7200 and Fujifilm X-T3) equipped with a macro lens objective (AF-S VR Micro-Nikkor 105mm f/2.8G and Fujinon XF 80 mm f/2.8 R LM OIS W Macro) for subsequent taxonomic confirmation. We counted separately all insects making contacts with the female flowers. Each daily session lasted approximately from 10:00 to 15:00 hour, with two observers surveying eight trees each. The order of tree visits and their allocation to each observer differed each time. We then edited the photographs, annotated them (metadata included observer name, day and time of observation, identity of the tree surveyed and its phenological stage) and sorted them in a photo library for validation. For arthropod taxonomic identification, we relied on the Spipoll website (<http://spipoll.snv.jussieu.fr/mkey/mkey-spipoll.html>) and on “Le monde des Insectes” (<https://www.insecte.org/>).

## Pollination syndrome

To establish the pollination syndrome of chestnut, we relied on previous descriptions of wind-, insect- and beetle-pollination syndromes (Culley et al. 2002; Faegri

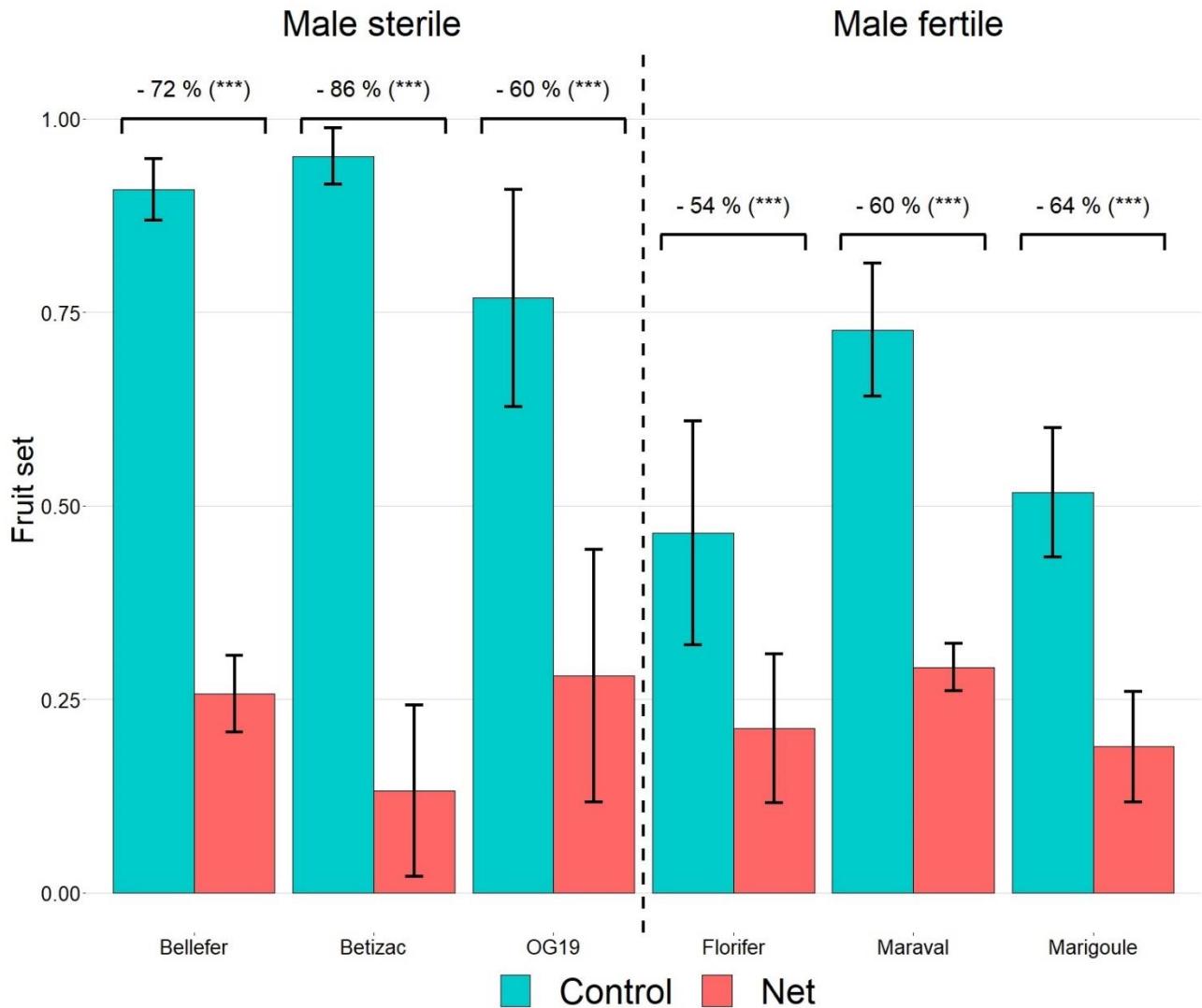


Figure 5: Insect exclusion experiment: comparison between male-sterile trees (on the left) and male-fertile trees (on the right). Average fruit set and standard deviation are measured on control and netted branches of six chestnut varieties including three male-sterile varieties and three male-fertile ones.

and van der Pijl 1979; Friedman and Barrett 2009; Gottsberger 1977; Mangla and Gupta 2015). We searched for relevant published data on chestnuts and oaks (genus *Quercus*) and completed this with our own observations. We distinguished directly observable and measurable plant traits typically used to establish pollination syndrome sensu stricto from other plant features (pollen dispersal ability, pollen nutritional value to insects, plant distribution, plant genetic structure...) that indirectly help characterize the pollination mode.

### Statistical analyses

We decided to use parametric or nonparametric statistical methods after applying a Shapiro-Wilk test to the data, which we visually inspected using four diagnostic plots: Residuals vs fitted values, Q-Q plot, Scale location plot and Cook's distance plot.

### Insect exclusion experiments

To assess the role of tulle nets on fruit production in each experiment, we used a Fisher exact test on a two-way table containing the number of developed and empty fruits for the control and the treatment. To compare fruit set between varieties, we performed a bidirectional Wilcoxon rank-sum test to compare fruit set across ramets of each variety.

### Insect monitoring

To test if flowering trees attract arthropods, we compared the average number of arthropods per collection seen on each tree during and outside the flowering period. We then performed a unidirectional paired-Wilcoxon rank-sum test across all 16 trees to check if arthropods were indeed more abundant during flowering. To test if some insect species were

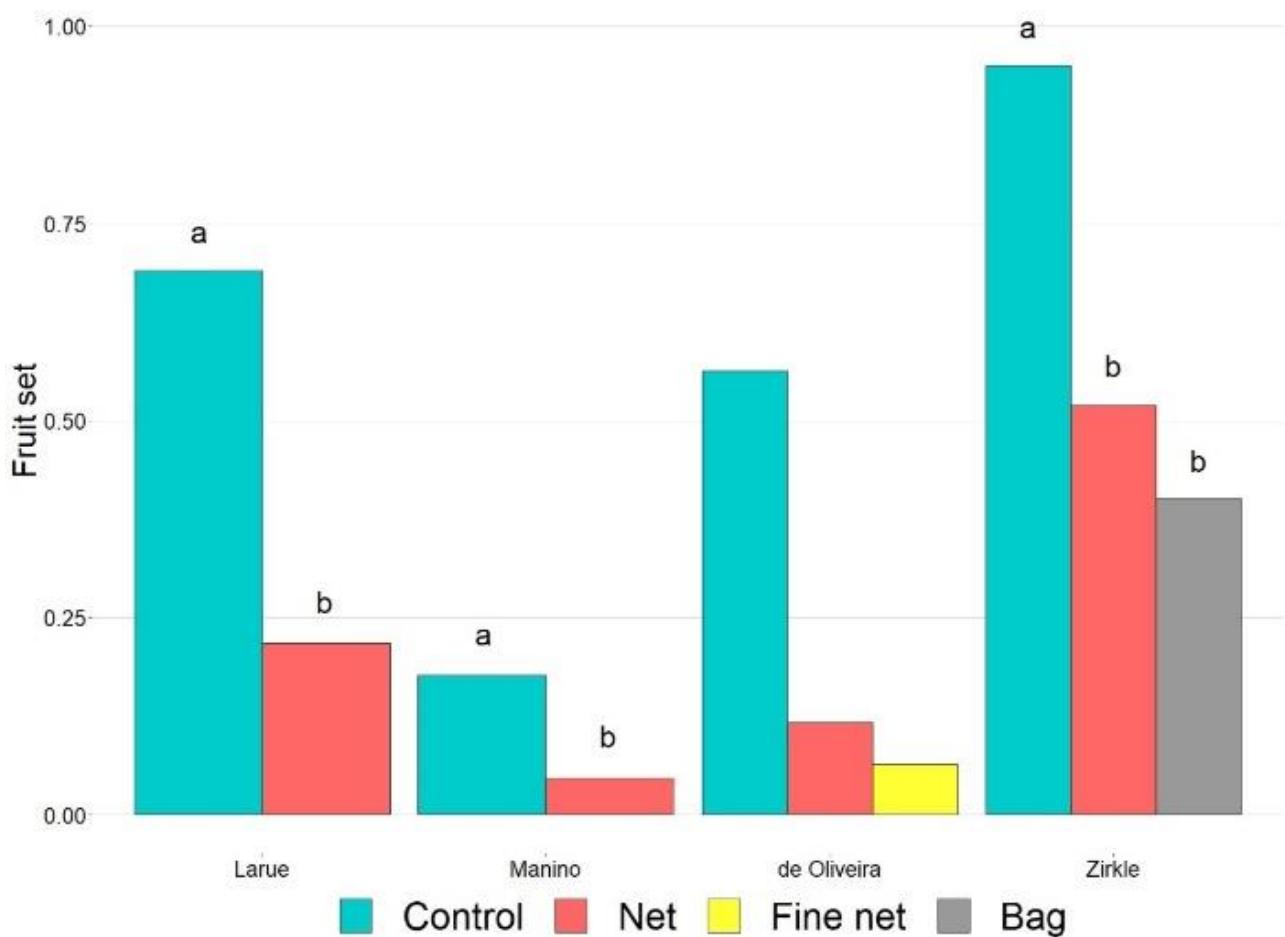


Figure 6: Comparison of fruit set in four different insect exclusion experiments (this study, Manino et al. 1991, de Oliveira et al. 2001, Zirkle 2017). The x-axis gives the name of the first author of the study. Different letters indicate significant differences within an experiment.

relatively more frequent on female flowers than on whole trees, we applied a Fisher's exact test on a two-way table with the abundance of each insect versus all other insects on trees versus on female flowers. To check whether some insect species were more attracted by male-fertile than by male-sterile trees, we applied a bidirectional unpaired Wilcoxon rank-sum test to compare insect mean abundance per collection across the two groups of trees. We then used a Fisher's exact test to check if insect preferences for male-fertile versus male-sterile trees varied according to the scale of observation: whole tree or female flowers. Finally, we investigated when insects visit female flowers. For each tree, we subdivided all collections made during the flowering period in two groups. The first group included all collections where we saw at least one insect on female flowers. The second group included all collections where we saw no insect on female flowers. We then compared the number of days elapsed since the onset of flowering between the two sets of collections using a bidirectional Wilcoxon rank-sum test.

All statistical analyses were performed in R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), and all graphics were constructed with the package ggplot2, ggthemes and cowplot.

## RESULTS

### Insect exclusion experiment

#### Fruit set of the six studied varieties

Average fruit set was 69% in the control (open pollination) and only 22% for the netted branches (Figure 5, Appendix 1). Fruit set thus dropped by 70% when preventing insects to contact female flowers (Fisher's exact test,  $p < 10^{-15}$ ). In open-pollinated branches of male-fertile trees, average fruit set was 48% compared to 89% in male-sterile ones. In netted branches compared to open-pollinated ones, fruit set decreased by 57% in male-fertile trees and by 75% in male-sterile ones.

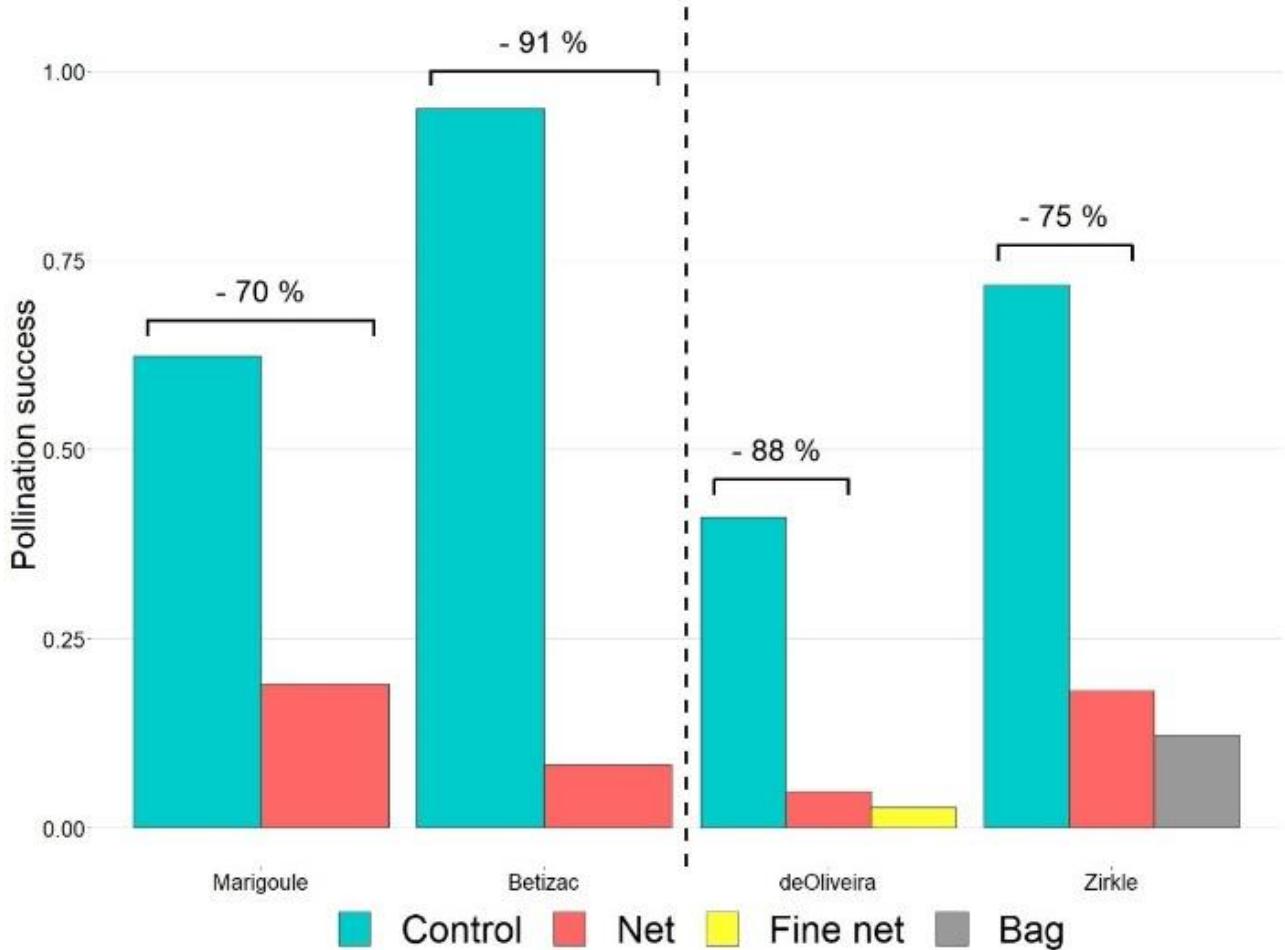


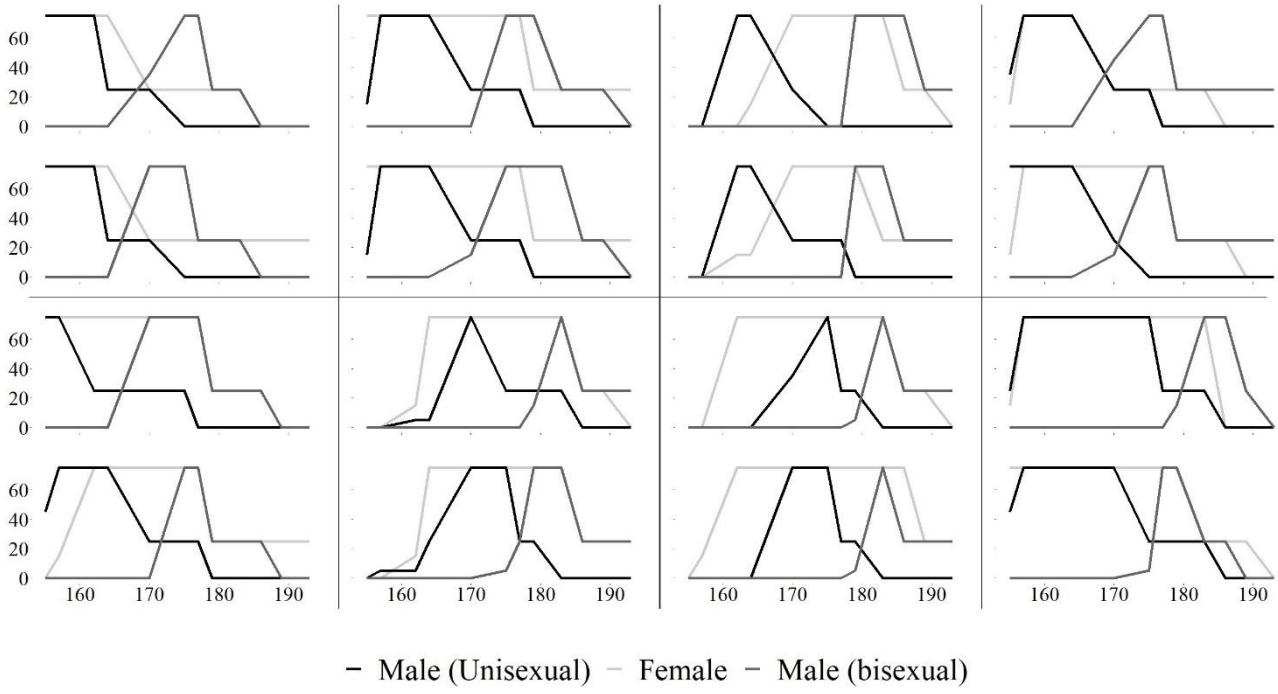
Figure 7: Comparison of pollination success (combining the effects of burr set and of fruit set/burr) in different insect exclusion experiments. On the left, results from this study for two varieties, a male-fertile one (Marigoule) and a male-sterile one (Bétizac). On the right, experiments by de Oliveira et al. (2001) and by Zirkle (2017).

### Comparison with other studies

Previous insect exclusion studies also reported a marked decrease in fruit set in chestnuts (Figure 6). In Manino et al. (1991) experiment, overall fruit set was quite low: 18% for the controls and 5% for netted branches, representing a 74% drop in fruit set (Fisher's exact test,  $p < 10^{-8}$ ). In the de Oliveira et al. (2001) experiment, the control fruit set was 57% and the netted fruit set 12%, a drop of 79%. In the study of Zirkle (2017), the control fruit set was 95% while the netted fruit set was 52%, a drop of 54% (Fisher's exact test,  $p < 10^{-5}$ ). de Oliveira et al. (2001) used two types of nets differing in mesh size. The average fruit set of the fine net treatment was 7% compared to 12% for the net with larger mesh size, a significant difference in three of the eight studied varieties (results not shown). Zirkle's (2017) study also included another treatment (pollination bags). The fruit set in the bags (40%) did not differ significantly from that found in the netting treatment (52%).

### Pollination success

For Marigoule and Bétizac cultivars, we could correct for differences in burr set, providing a better estimate of overall pollination success (see Material and Methods). Pollination success for the treatment was larger for Marigoule (19%) than for Bétizac (9%). However, there were large differences in pollination success across individual trees (i.e. ramets) of each variety, so the difference was not significant (Wilcoxon test,  $p = 0.14$ ). The overall reduction in pollination success was 70% for Marigoule and 91% for Bétizac (Figure 7). These values are comparable to those of de Oliveira et al. (2001) and Zirkle (2017), who assessed both burr set and fruit set per burr. In the de Oliveira's experiment, pollination success was 41% for the control, 5% for the large net treatment and 3% for the fine net treatment. The average reduction in pollination success between the control and large net treatments reached 88%. In Zirkle's experiments, the pollination success was 72% for the control, 18% for the netting treatment and 12% for the bagging



*Figure 8: Phenology of the 16 monitored chestnut trees. Left, male-fertile trees. Right, male-sterile trees. The two clonal replicates from each of the eight varieties are represented one above the other. For each diagram, x-axis is expressed in Julian days and y-axis in percentage of open flowers*

treatment. The average loss in pollination success between control and netting treatment reached 75%.

## Monitoring flowering phenology and pollination

### Flowering phenology

We monitored phenology from early June (day 152, shortly after the earliest trees had started to bloom), to mid-July (day 190) (Figure 8). The latest trees were in full bloom 10 days after the earliest. Male unisexual catkins bloomed first (peak 1). About 15 days later, male flowers of bisexual catkins started to bloom (peak 2). The female flowers were receptive during two to three weeks, resulting in a long overlap between the male and female flowering periods. There was no clear difference in flowering phenology between male-fertile and male-sterile trees.

### Flowering characteristics of chestnut trees

We sampled an average of 47 (7-157) bisexual catkins and 978 (274-1779) unisexual male catkins per tree. Mean length of the male part of bisexual catkins was 9.5 cm (6.6-13.0) and mean length of unisexual male catkins was 13.1 cm (6.7-17.7). Both types of male catkins harboured an average of 40 (31-48) male flowers per centimetre of catkin. The mean circumference of these male catkins in male-fertile

plants was 1.3 cm (1.1-1.5). There were generally one and up to three female inflorescences (on average 1.3) per bisexual catkin, comprising typically three female flowers each. The upper receptive surface of a female inflorescence (about 20 styles, 5-8 per flower) was 68 mm<sup>2</sup> (44-89). On a bisexual catkin, the average distance separating the female flowers from the male flowers was 1.6 cm (1.1-2.1). In terms of sex ratio, there were 29 (11-78) unisexual male catkins for every bisexual catkin. Hence, for each female flower, there were on average 4000 male flowers (1300-6200). In terms of area that would be visible to insects (surface of the cylindrical male catkin versus surface of the female inflorescences) in male-fertile trees, the ratio was 2300 (1100-3800).

The ratio of male flowers (and hence of pollen and/or nectar) produced in peak 1 versus peak 2 was 41 (13-109), that is, most male flowering (>97%) took place during peak 1. The pollen/ovule ratio, estimated in eight male-fertile chestnut trees, ranged from 10 million to 29 million, with an average of 21 million.

The female flowers are strongly reminiscent of male flowers: their numerous white erect styles are similar in appearance and colour to the stamens of male flowers (Figure 9c). The clustering of female flowers in small inflorescences reinforces the impression that we are dealing with a portion of a male catkin. We found some rare catkins with only female flowers.



Figure 9: The case for automimicry. a) Normal bisexual catkin, with male flowers in bloom. b) Abnormal catkin, where male flowers are replaced by female flowers. Note the overall similarity with the normal bisexual catkin above. c) Close-up of the basis of a bisexual catkin. Note the similar aspect of the styles and stamens (length, colour, and grouping).

Tableau 1: List of the main arthropod taxa observed on chestnut trees and on female flowers, and comparison of their abundance on flowering and non-flowering trees and on male-fertile and male-sterile trees.

Taxon <sup>1</sup>	Order	Family	#coll	N	N/col	x flower	flower	test	w pol	w/o pol	test	♀ fl
<i>Synema globosum</i>	Arachnida	Thomisidae	32	37	0.23	0.11	<u>0.28</u>	*	0.29	0.26	ns	0
<b>Arachnida</b>	<b>Arachnida</b>		<b>63</b>	<b>99</b>	<b>0.61</b>	<b>0.54</b>	<b>0.64</b>	ns	<b>0.66</b>	<b>0.61</b>	ns	<b>0</b>
<i>Coccinella septempunctata</i>	Coleoptera	Coccinellidae	27	69	0.43	0.02	<u>0.59</u>	**	0.58	0.60	ns	2
ladybird	Coleoptera	Coccinellidae	13	16	0.10	0.02	<u>0.13</u>	*	0.10	0.16	ns	1
ladybird larva	Coleoptera	Coccinellidae	47	96	0.59	0.74	0.53	ns	0.59	0.47	ns	1
<i>Paracorymbia fulva</i>	Coleoptera	Cerambycidae	16	34	0.21	0.00	<u>0.29</u>	**	0.54	0.04	ns	1
Oedemerid beetle	Coleoptera	Oedemeridae	13	17	0.10	0.02	<u>0.14</u>	*	0.20	0.07	ns	0
<i>Cteniopus sulphureus</i>	Coleoptera	Tenebrionidae	28	203	1.25	0.00	<u>1.75</u>	**	3.10	0.35	ns	2
<i>Rhagonycha fulva</i>	Coleoptera	Cantharidae	110	1500	9.3	1.5	<u>12.3</u>	***	11.4	13.3	ns	42
<b>Small beetles</b>	<b>Coleoptera</b>		<b>46</b>	<b>56</b>	<b>0.35</b>	<b>0.07</b>	<b>0.46</b>	***	<b>0.66</b>	<b>0.25</b>	ns	<b>0</b>
<b>Larger beetles</b>	<b>Coleoptera</b>		<b>74</b>	<b>275</b>	<b>1.70</b>	<b>0.07</b>	<b>2.34</b>	**	<b>4.14</b>	<b>0.49</b>	*	<b>3</b>
<b>Coccinellidae</b>	<b>Coleoptera</b>		<b>97</b>	<b>229</b>	<b>1.4</b>	<b>1.0</b>	<b>1.6</b>	**	<b>1.6</b>	<b>1.5</b>	ns	<b>6</b>
<b>Coleoptera</b>	<b>Coleoptera</b>		<b>140</b>	<b>2062</b>	<b>12.7</b>	<b>2.7</b>	<b>16.7</b>	***	<b>15.6</b>	<b>17.8</b>	ns	<b>51</b>
<i>Sphaerophoria scripta</i>	Diptera	Syrphidae	28	45	0.28	0.09	<u>0.35</u>	*	0.25	0.46	ns	1
Syrphid flies	Diptera	Syrphidae	12	19	0.12	0.07	0.14	ns	<u>0.25</u>	0.02	*	0
Tachinid fly #1	Diptera	Tachinidae	85	218	1.35	1.13	<u>1.43</u>	*	1.25	1.61	ns	2
<i>Minettia</i>	Diptera	Lauxaniidae	35	46	0.28	0.15	<u>0.34</u>	*	0.37	0.30	ns	1
<i>Helina reversio</i>	Diptera	Muscidae	35	50	0.31	0.39	0.28	ns	0.37	0.18	ns	2
<i>Sarcophaga</i>	Diptera	Sarcophagidae	14	21	0.13	0.11	0.14	ns	0.19	0.09	ns	1
<i>Pachygaster atra</i>	Diptera	Stratiomyidae	28	48	0.30	0.39	0.26	ns	0.12	0.40	ns	0
Fly	Diptera		82	156	0.96	0.87	1.00	ns	0.80	1.21	ns	3
small black fly	Diptera		27	36	0.22	0.15	0.25	ns	0.29	0.21	ns	0
<b>Diptera</b>	<b>Diptera</b>		<b>153</b>	<b>752</b>	<b>4.6</b>	<b>4.0</b>	<b>4.9</b>	ns	<b>5.2</b>	<b>4.7</b>	ns	<b>11</b>
<i>Apis mellifera</i>	Hymenoptera	Apidae	47	330	2.0	0.0	<u>2.8</u>	***	<u>4.8</u>	0.8	**	1
wild bees	Hymenoptera	Apidae	22	26	0.16	0.09	<u>0.19</u>	**	0.22	0.16	ns	0
Halictid bees	Hymenoptera	Halictidae	36	109	0.67	0.04	<u>0.92</u>	***	<u>1.7</u>	0.1	**	0
<i>Bombus terrestris</i>	Hymenoptera	Apidae	28	60	0.37	0.04	<u>0.50</u>	*	<u>0.97</u>	0.02	***	0
<b>Anthophila</b>	<b>Hymenoptera</b>		<b>73</b>	<b>533</b>	<b>3.3</b>	<b>0.22</b>	<b>4.51</b>	***	<b>7.8</b>	<b>1.1</b>	***	<b>2</b>
Ichneumonidae	Hymenoptera	Ichneumonidae	24	24	0.15	0.20	0.13	ns	0.08	0.18	ns	0
Microhymenoptera	Hymenoptera		18	60	0.37	0.89	0.16	ns	0.05	0.28	ns	0
Tenthredinoidea	Hymenoptera		19	20	0.12	0.07	0.15	*	0.12	0.18	ns	0
<b>Other Hymenoptera</b>	<b>Hymenoptera</b>		<b>61</b>	<b>131</b>	<b>0.81</b>	<b>1.43</b>	<b>0.56</b>	ns	<b>0.37</b>	<b>0.75</b>	ns	<b>0</b>
<i>Formica</i>	Hymenoptera	Formicidae	24	60	0.37	0.20	0.44	ns	0.31	0.58	ns	0
<i>Formica sanguinea</i>	Hymenoptera	Formicidae	11	35	0.22	0.04	<u>0.28</u>	*	0.19	0.39	ns	0
Formicinae	Hymenoptera	Formicidae	44	208	1.28	1.67	1.13	ns	0.80	1.47	ns	1
Myrmicinae	Hymenoptera	Formicidae	17	105	0.65	0.63	0.66	ns	0.61	0.70	ns	1
<b>Formicidae</b>	<b>Hymenoptera</b>	<b>Formicidae</b>	<b>90</b>	<b>422</b>	<b>2.6</b>	<b>2.7</b>	<b>2.6</b>	ns	<b>2.0</b>	<b>3.2</b>	ns	<b>2</b>
<b>Hymenoptera</b>	<b>Hymenoptera</b>		<b>135</b>	<b>1086</b>	<b>6.7</b>	<b>4.3</b>	<b>7.6</b>	*	<b>10.2</b>	<b>5.0</b>	*	<b>4</b>
Cicadellidae	Hemiptera	Cicadellidae	36	46	0.28	0.41	0.23	ns	<u>0.32</u>	0.14	*	0

Other insects				72	111	0.69	0.76	0.66	ns	0.83	0.47	ns	0
pupa of ladybird	Coleoptera	Coccinellidae		18	27	0.17	0.09	0.20	*	0.29	0.11	ns	0
<i>Lymantria dispar</i> caterpil.	Lepidoptera	Erebidae		30	49	0.30	0.41	0.26	ns	0.25	0.26	ns	0
<b>Larva</b>				<b>53</b>	<b>93</b>	<b>0.57</b>	<b>0.57</b>	<b>0.58</b>	ns	<b>0.76</b>	<b>0.39</b>	ns	<b>0</b>
<b>Total</b>				<b>162</b>	<b>4203</b>	<b>25.94</b>	<b>12.8</b>	<b>31.1</b>	***	<b>34.9</b>	<b>27.3</b>	ns	<b>66</b>
<b>Total w/o <i>Raghonycha</i></b>				<b>161</b>	<b>2703</b>	<b>16.69</b>	<b>11.3</b>	<b>18.8</b>	**	<b>23.5</b>	<b>13.9</b>	*	<b>24</b>
<b>Richness</b>				<b>162</b>	<b>1371</b>	<b>8.46</b>	<b>6.7</b>	<b>9.2</b>	**	<b>10.3</b>	<b>8.0</b>	*	

<sup>1</sup>Headings: Taxon studied; Order; Family; #coll: number of collections where the taxon was detected; N: total number of individuals observed; N/col: mean number of individuals per collection; x flower: mean number of individuals per collection for non-flowering trees; flower: idem for flowering trees; Test: Wilcoxon paired test of greater abundance of the taxon on flowering than on non-flowering trees; w pol: mean number of individuals per collection for male-fertile trees; w/o pol: idem for male-sterile trees; Test: Wilcoxon test of the difference in mean abundance between male-fertile and male-sterile trees; ♀ fl.: number of insects seen on female flowers.

When comparing such female catkins with normal bisexual ones, the similarity between male and female flowers was particularly striking (Figures 9a and 9b).

### Arthropod visitors

**Overview.** We observed and counted arthropods on the 16 trees during 162 sessions of 20 minutes, corresponding to a total of 32 hours and 20 minutes. We surveyed each tree about 10 times, starting on June 4. At that time, only three trees had started to flower. We stopped the survey when all trees had finished flowering, on July 12. Altogether, we made 15 collections on trees that had not yet flowered, 54 during the first peak of male flowering, 18 between peak 1 and peak 2, 44 during peak 2 and 31 afterwards. That is, 28% of the collections were outside the flowering period of the trees, enabling to test if flowering trees attract arthropods (Table 1, Appendix 2).

We inventoried 4203 arthropods grouped in 129 taxa corresponding to at least 101 species. The most abundant orders were Coleoptera (2062 individuals and 21 taxa) followed by Hymenoptera (1086, 36 taxa) and Diptera (752, 36 taxa). The most abundant insect species by far was the common red soldier beetle (*Rhagonycha fulva*, 1500 individuals), followed by the honeybee (330 individuals), a Tachinid fly (218 individuals), and the sulphur beetle (*Cteniopus sulphureus*, 203 individuals).

There were nearly three times as many arthropods found on flowering trees than on non-flowering trees (31.1 compared to 12.8,  $p < 0.001$ ). Among all arthropod taxa with more than 15 individuals, 25 out of 34 were more abundant on flowering trees and 18 significantly so. The flower-

visiting species included a crab spider (*Synema globosum*), seven Coleoptera, including several ladybirds as well as the red soldier beetle and the sulphur beetle, three bees (the honeybee, a bumblebee (*Bombus terrestris*), and halictid bees), a syrphid fly (*Sphaerophoria scripta*) and a Tachinid fly. The mean arthropod richness measured on flowering trees was also significantly higher than on non-flowering trees (9.2 versus 6.7,  $p < 0.001$ ). On flowering trees, insects visiting male catkins were readily dusted with chestnut pollen (Figure 10a,b,c).

In total, we observed 66 insects on female flowers (Figure 10 and 11). This represents a small fraction (1.8%) of the insects observed on flowering trees. They were typically observed landing on or taking-off from the styles (Figure 10d,e), walking on the tip of the styles (Figure 11a,d,e), or apparently licking the tip of the styles (Figure 11b,c). In other cases, the contact with the female flower seemed purely accidental (Figure 11f). We found 51 beetles on female flowers (42 red soldier beetles, 6 ladybirds, 2 sulphur beetles, *C. sulphureus*, and 1 tawny longhorn beetle, *Paracorymbia fulva*), representing 77% of the total, a higher proportion than on trees (52%, see Figure 12). We also found 11 flies and 4 Hymenoptera on female flowers, including 2 ants and 2 bees, one of which was an honeybee.

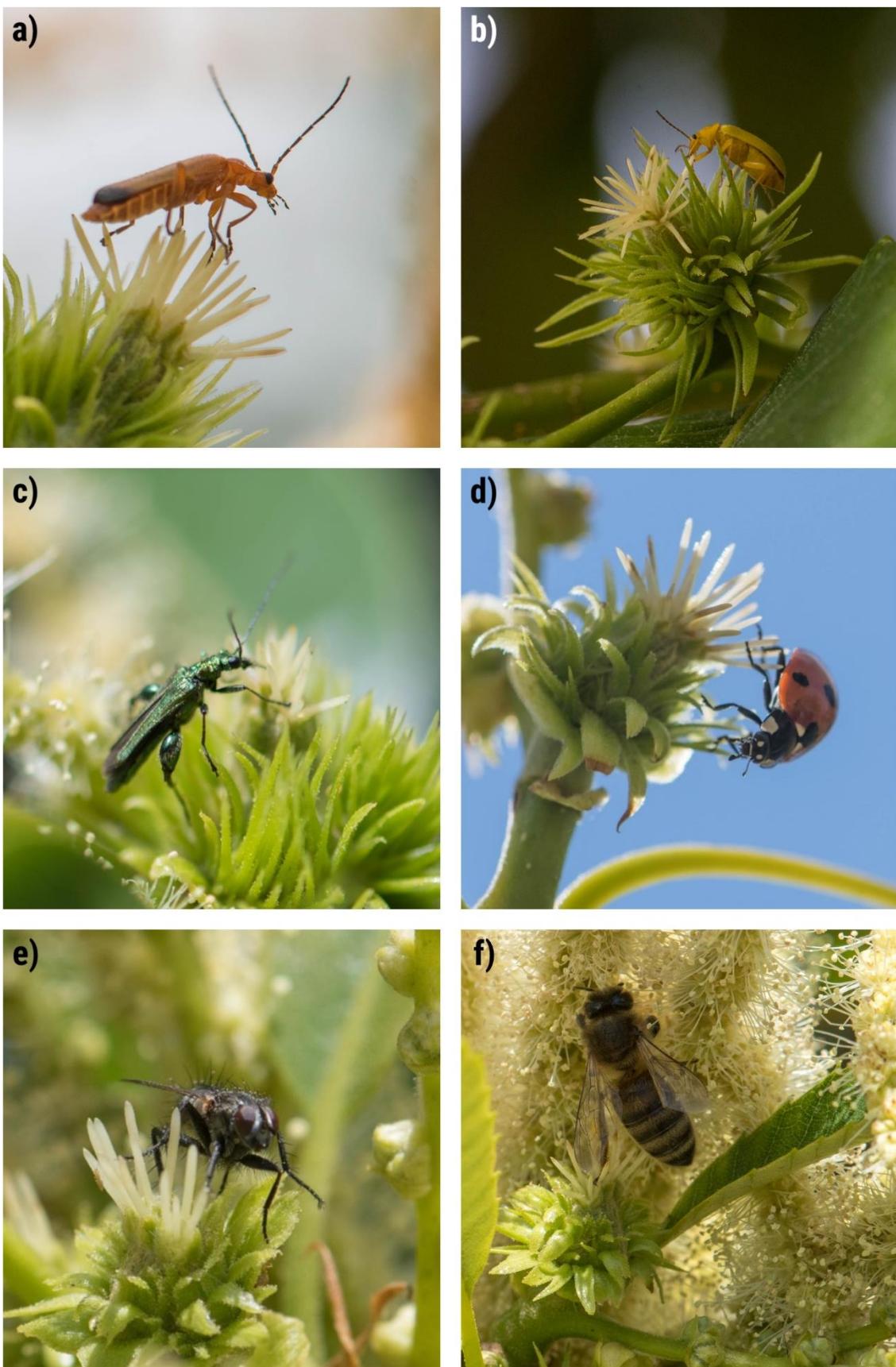
We then compared the proportion of Coleoptera, Diptera and Hymenoptera on trees versus on female flowers. In Coleoptera, we distinguished the common red soldier beetle from other species. In Hymenoptera, we contrasted bees (*Anthophila*) with other species. We found that red soldier beetles were over-represented on female flowers (Fisher's exact test,  $p = 10^{-4}$ ) and Hymenoptera under-represented on female flowers



Figure 10: Beetles on chestnut flowers. Beetles foraging in male catkins and abundantly covered with sticky chestnut pollen: (a) bee beetle (*Trichodes alvearius*), (b) soldier red beetle (*Rhagonycha fulva*) and (c) tawny longhorn beetle (*Paracorymbia fulva*). Soldier red beetle standing on (d) and taking off from (e) a female inflorescence. Notice also the couple underneath the female inflorescence: the abundance of mating insects seen on chestnut trees at the end of the flowering season strongly suggests that these insects use trees as mating rendezvous.

(Fisher's exact tests,  $p = 0.006$  for bees and  $p = 0.006$  for other Hymenoptera). Other beetles as well as Diptera were neither overrepresented nor underrepresented on female flowers (Fisher's exact tests,  $p > 0.05$ ) (Figure 12).

*Male-fertile versus male-sterile trees.* We compared insects present on flowering male-fertile and male-sterile trees, predicting it should be more abundant on male fertile trees.



*Figure 11: Insects visiting female flowers. a) Soldier red beetle (*Rhagonycha fulva*) standing on the extremities of the styles of a female inflorescence. b) Sulphur beetle (*Cteniopus sulphureus*) licking the stigmatic portion of a style. c) Idem for a swollen-thighed beetle (*Oedomera sp.*). d) Adult ladybird walking on a female flower. e) Fly perched on a female flower. f) Pollen-collecting honeybee (*Apis mellifera*) accidentally touching a female flower.*

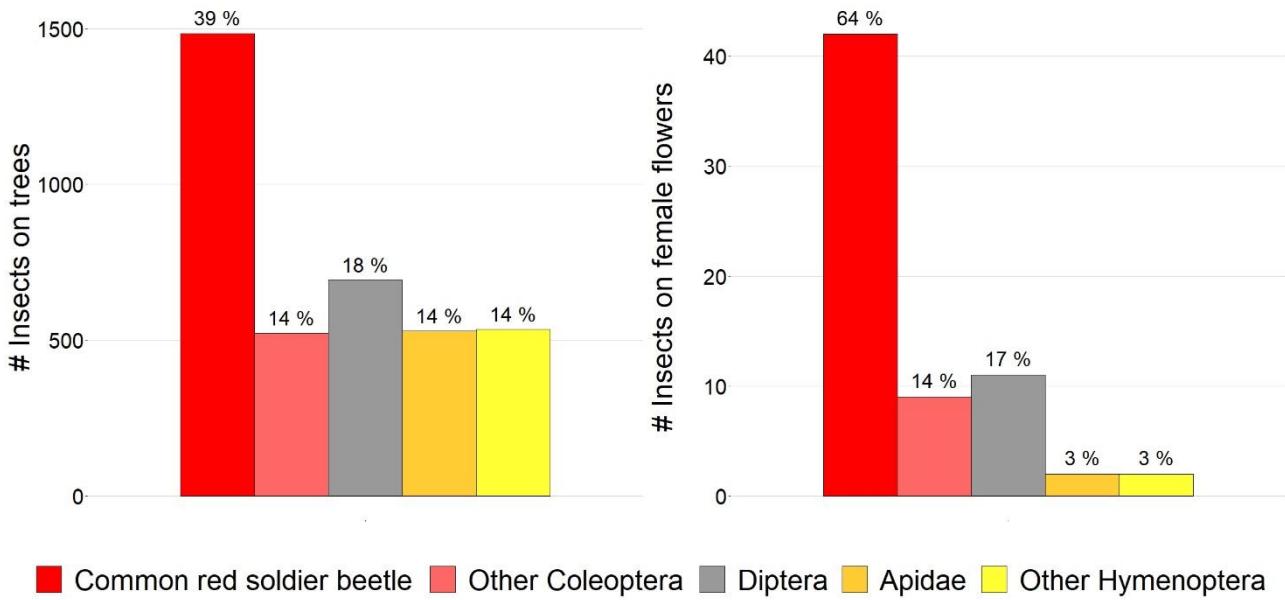


Figure 12: Abundance of insects on chestnut trees versus on female flowers.

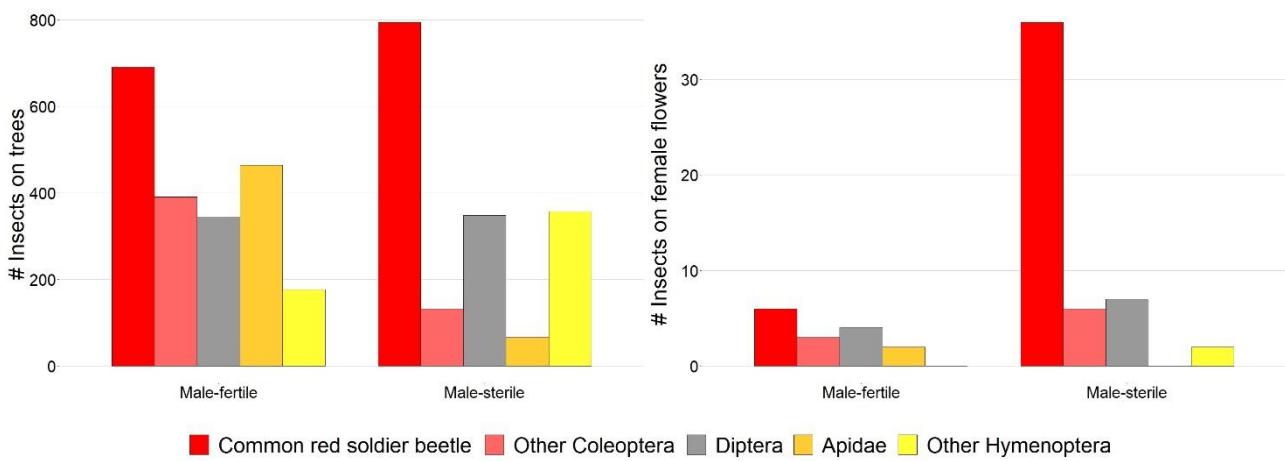


Figure 13: Abundance of insects on chestnut trees versus on female flowers, as a function of tree gender.

Overall, we found no significant difference (Figure 13, Table 1 and Appendix 2), but the difference became significant after excluding red soldier beetles (23.5 insects on male-fertile trees and 13.9 on male-sterile ones,  $p < 0.05$ ). Insects showing a preference for male-fertile trees included larger beetles (all beetles larger than 0.7 mm except red soldier beetles), syrphid flies, and three bees: the honeybee, halictid bees and bumblebees. Overall, arthropod richness was higher on male-fertile trees than on male-sterile ones (10.3 versus 8.0,  $p < 0.05$ ).

Contrasting the relative abundance of insects on trees versus on female flowers, we found that red soldier beetles as well as the other beetles were overrepresented on female flowers from male-sterile

trees (Fisher's exact tests,  $p = 2.10^{-5}$  for soldier beetles, 0.01 for the other beetles). This is particularly remarkable for the other beetles because they were more numerous on male-fertile trees. The relative abundance of other insects (Diptera and Hymenoptera) did not differ significantly between trees and female flowers (Fisher's exact tests,  $p > 0.05$ ).

*Insect visits as a function of the flowering stage of trees.* Trees undergo important changes during the flowering period. The most massive flowering display takes place during the first flowering peak. At that time, about 97% of the male flowers were in bloom, resulting in the production of large amounts of reward in the form

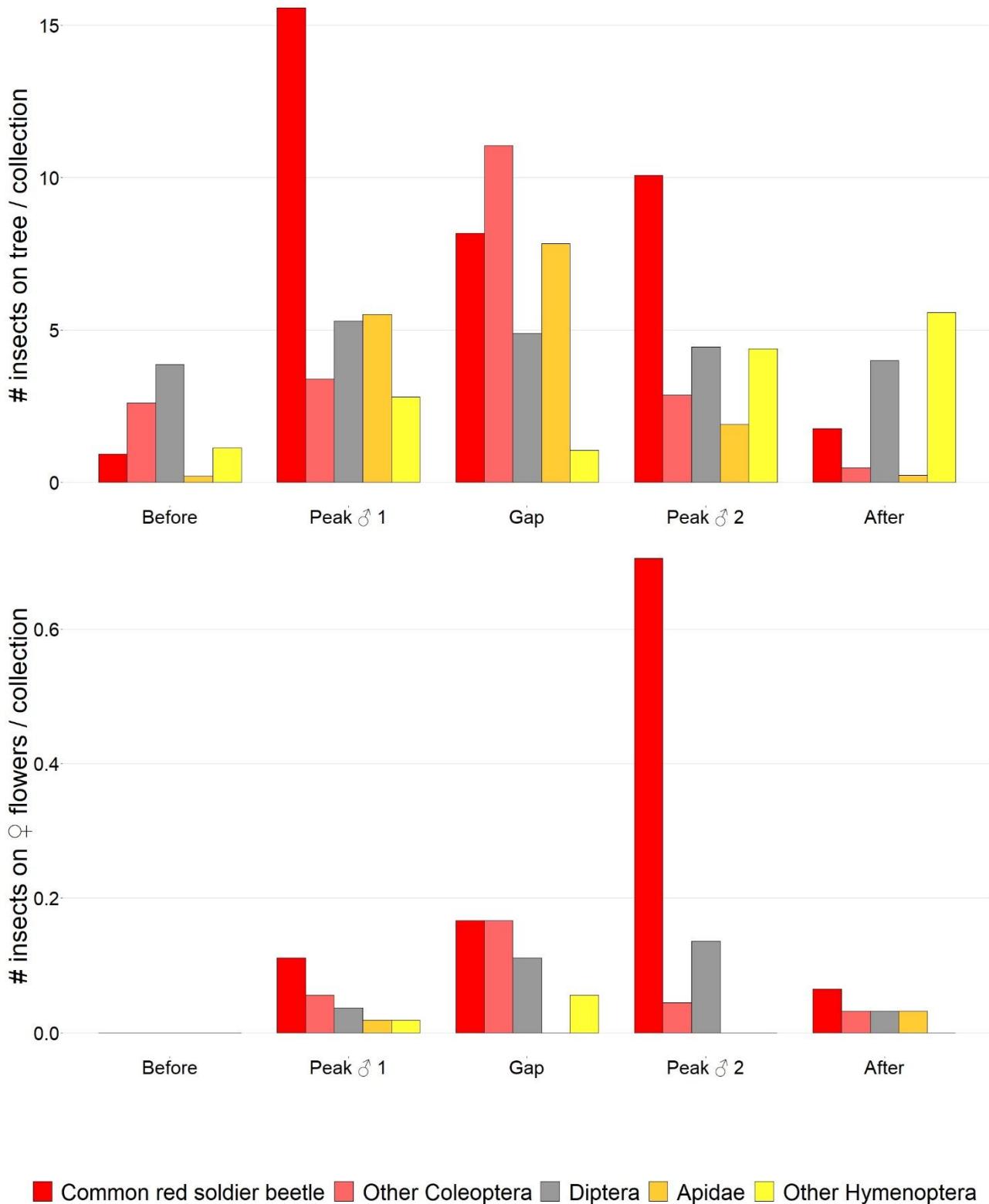


Figure 14: Abundance of insects on chestnut trees and on female flowers, as a function of the flowering stage of the trees.

of nectar and (in male-fertile trees) of pollen. Yet insect visits to trees was maximal during peak 1 only for red soldier beetles and to a smaller extent for Diptera (Figure 14). For the other beetles and for bees,

insects were most abundant during the flowering gap between peak 1 and 2, when male flowers from unisexual catkins had started to fade and those from bisexual catkins had not yet started to bloom. During

Tableau 2: Chestnut pollination syndrome in comparison with oak.

Chestnut	Oak	Syndrome	Comments	References
Plant traits				
Massive showy white inflorescence	Yellow inflorescence	insect		Groom 1909; Porsch 1950
Strong amino acid semen-like fragrance	Odorless	beetle, fly		Porsch 1950; Zhang et al. 2019
Late flowering after leaves unfold	Early spring flowering before leaves unfold	insect	Late flowering coincides with maximum insect activity and loss of airborne pollen due to foliage interception	Groom 1909; Kaul 1986; Millerón et al. 2012; Bastl et al. 2020
Open flat blossoms, reduced perianth	Reduced perianth	beetle, wind		Faegri and van der Pijl 1979
Nectar produced by male catkins (~14 kg/ha)	Nectarless	insect		Baude et al. 2016
Hexose rich or hexose dominant floral nectar	/	Short-tongued pollinators	Long-tongued pollinators prefer sucrose rich nectar, short-tongued pollinators prefer hexose rich nectar	Baker and Baker 1983; Kim et al. 2020
Long, conspicuous, erect stamens, brush type	Shorter pendulous flexible stamens	beetle	Erect stamens less appropriate for pollen take off by wind	Groom 1909; Faegri and van der Pijl 1979
12 stamens per flower	6 stamens per flower	beetle	Polyandry is often considered a shared trait of beetle-pollinated systems	Gottberger 1977
Tiny butterfly-shaped anthers (<0.01 mm³)	100 x larger anthers (>1 mm³)	beetle	Diffuse packaging of pollen to help cope with pollen-consuming beetles	Molina et al. 1996; Manos et al. 2001; Zhong et al. 2020
Huge pollen production: 2.0×10¹² pollen grains/ha/yr	Slightly lower pollen production: 1.2×10¹² pollen grains/ha/yr	beetle, wind	Beetles are rather clumsy pollinators that “waste” and consume pollen	Kiyonaga 1991, 1995; Faegri and van der Pijl 1979
Huge pollen/ovule ratio: 21.106, all the more remarkable since ovary is pluri-ovulate	Unknown but presumably lower pollen/ovule ratio	beetle, wind	Highest pollen/ovule value reported to date. Some beetle-pollinated trees also have high ratios	This study; Cruden 2000; Erbar and Langlotz 2005
Tiny, smooth prolate pollen grains (15x11µm)	Pollen grains 10 x larger (31x26 µm), subprolate	beetle, wind	Pollen too small for effective capture on stigmas	Whitehead 1983; Diethart 2020; Halbritter 2020
Abundant pollenkitt, pollen grains sticky clumping together in masses	Less pollenkitt, pollen dry and powdery	insect	Sticky pollen adapted to insect-pollination	Groom 1909; McKay 1972; Hesse 1978
No visible release of pollen when inflorescences are touched	Pollen readily released when inflorescences are touched	insect		Groom 1909; Porsch 1950
Pollen grains eventually dry: pollen export by insects precedes pollen peak in the air	Pollen dry and powdery	mixed	Is the change in stickiness truly a wind adaptation?	Groom 1909; Porsch 1950; Clapper 1954; Sabugosa-Madeira et al. 2008
Bisexual protogynous catkins	Absence of bisexual catkins	insect	Cosexuality favors insect pollination when female flowers have no reward	McKay 1972; Kaul 1986; Zirkle 2017
Ovaries and ovules protected by hardened spiny bracts and by the close massing together of the flowers	Ovaries more accessible to herbivorous insects	beetle	Adaptations against damage to the ovules expected in flowers of beetle-pollinated plants	Grant 1950; Proctor et al. 1996

Chestnut	Oak	Syndrome	Comments	References
<b>Plant traits</b>				
5-8 milky-white needle-shaped styles per flower; brush-like aspect reminiscent of stamen brush	3 slightly-recurved styles	insect	"Mistake" pollination by insects of auto-mimetic female flowers, female flowers used as take-off/landing platform	This study; Nakamura 1992; Fan et al. 2015
Tiny hollow stigmas (~0,005mm <sup>2</sup> )	10x larger capitate stigmas (~0,05mm <sup>2</sup> )	insect		Nakamura 1992; Boavida et al. 1999
Stigma's aperture layered with secretory cells	Much larger dry stigma	insect	Stigmatic secretions used as reward for insects?	Porsch 1950; Feijó et al. 1999; this study
12-16+ ovules/ovary	6 ovules/ovary	insect	Few large clustered flowers with many ovules not optimal to maximize airborne pollen capture	Porsch 1950; Nakamura 1992; Friedman and Barrett 2011
<b>Other features</b>				
Occurrence in comparatively species-rich, warm and humid conditions	Can occur further north, in colder or drier conditions	insect	Reduced chance for wind-transported pollen reaching conspecific flowers in species-rich communities; less constraints on nectar production in warm and wet habitats; less effective wind dispersal in humid areas	Rech et al. 2016; Thurm et al. 2018
Excellent nutritive value of pollen for bees, with positive effects on insects health	Good nutritive value for bees, but reduced digestibility	insect		Tasei and Aupinel 2008 ; Di Pasquale et al. 2013 ; Ghosh and Jung 2017
Stokes's terminal velocity of pollen ~1 cm/sec	terminal velocity 3-4 cm/sec	wind		Stanley and Linskens 1974; Tampieri et al. 1977
Long-distance pollen transport by wind	Idem	wind		Frei, 1997; Peeters and Zoller, 1988
Sharp decline of pollen concentration in the air away from trees; chestnut pollen often under-represented away from source	Oak pollen over-represented in lake samples	insect	Pollen decline away from trees caused by foliage interception or pollen clumping	Paillet et al. 1991; Conedera et al. 2006 ; López-Sáez et al. 2017; Fang et al. 2019 ; Jiang et al. 2020
Regular seed mast (no "masting")	Masting driven by pollen dynamics linked with spring weather conditions	insect	In wind-pollinated plants, seed production dynamics is fluctuating across years and synchronised among individuals	Zirkle 2017; Schermer et al. 2019
Relatively high genetic structure in <i>C. sativa</i> : FST=0.15 (Spain), 0.17 (Europe), 0.18 (Turkey)	Typically lower genetic structure: FST = 0.02 ( <i>Q. robur</i> ), 0.03 ( <i>Q. petraea</i> ), 0.10 ( <i>Q. ilex</i> ), 0.07 ( <i>Q. suber</i> )	small insects	Pollination by small insects leads to greater differentiation compared to pollination by large insects, vertebrates or wind	Michaud et al. 1995; Toumi and Lumaret 1998 ; Villani et al. 1999; Mattioni et al. 2008; Petit et al. 2003; Martin et al. 2012; Gamba and Muchhalia 2020

peak 2, corresponding to the flowering peak of male flowers from bisexual catkins, beetles were nearly as abundant as during peak 1 but the abundance of bees strongly declined.

We observed few insects on female flowers during peak 1 (Figure 14). Insects, mostly beetles and flies, were most frequent on female flowers during the flowering gap and during peak 2, with a marked increase of red soldier beetles during peak 2. On average, we found insects on female flowers 16.3 days after the onset of flowering. This is significantly later than expected by chance (12.1 days; Wilcoxon test,  $p = 0.014$ ), and nearly so if we exclude those collections where female flowers were not yet fully receptive (Wilcoxon test,  $p = 0.07$ ).

### Chestnut pollination syndrome

We found data for 21 plant traits useful to infer pollination syndromes in both chestnuts and oaks (Table 2). Among them, 16 point exclusively towards a biotic pollination syndrome, including at least five associated with cantharophily (beetle-pollination). Four others are equivocal, representing possible adaptation to either wind pollination or to beetle-pollination (small flowers with reduced perianth, huge pollen production, tiny pollen grains and high pollen/ovule ratio). Only one is suggestive of ambiphily: change from initially sticky to eventually dry pollen, allowing wind-dispersal of pollen grains not collected by insects. No trait unequivocally points exclusively towards wind pollination. Regarding the seven other attributes of chestnuts, five are suggestive of insect pollination and two of wind pollination.

## DISCUSSION

Insect exclusion experiments, performed on different continents, on different chestnut tree species and in different contexts, have all shown that fruit set is dramatically reduced (by about 80%) when insects cannot reach female flowers. This clearly points to a minor role for airborne pollen in chestnut pollination. The results also show that the role of airborne pollen can be easily overestimated if burr set is not taken into account. In fact, netting resulted in a particularly reduced burr set in the case of *C. ozarkensis* (Zirkle 2017). In this species, each burr is made of a single flower, not three as in other species of chestnuts, so pollination success depends to a larger extent on burr set than in other chestnut species.

Where does the pollen that formed the few fruits found in the nets come from? Airborne pollen that fertilizes seeds inside the nets can be brought by

wind but also by insects that lose pollen during their flights. Pierre et al. (2010) demonstrated experimentally the effectiveness of insect-assisted wind pollination in rapeseed, showing that at close range, honeybees participate to pollination without touching the female flowers by releasing pollen from their bodies. This hypothesis would be worth testing in chestnuts, as Hasegawa et al. (2015) have shown that bees carry high loads of outcrossed chestnut pollen. Selfing could also explain the origin of some of the nuts found inside the nets, as bagging had nearly the same effect than netting in Zirkle's (2017) experiment. Self-fertilization is typically a rare event in chestnut (Stout 1926; Hasegawa et al. 2009; Xiong et al. 2019), but selfing rate could increase in the absence of outcross pollen. Paternity analyses could help clarify this issue (Wright and Dodd 2013).

In principle, insect exclusion experiments could underestimate pollination by wind, as fine nets can reduce to some extent incoming wind flow (e.g. Ramsay et al. 2003; Bartomeus et al. 2014). Alternatively, exclusion experiments could overestimate pollination by wind, for several reasons. First, pollination is a frequency- and density-dependent process (Klein et al. 2017). Because airborne pollen has to compete with pollen brought by insects in the control but not in the treatment, a simple additive model might be misleading. Second, in chestnut orchards, tree density is typically much higher than under natural conditions, favoring wind pollination (Zirkle 2017). Third, in large orchards, the massive and abrupt flowering might overwhelm insect pollination capacities (Brittain et al. 2013). Hence, the figures obtained in orchards probably overestimate the importance of wind pollination compared to natural conditions. Overall, the results therefore point to a major role of insects in chestnut pollination, raising the question of the mechanisms favoring insect pollination.

In this study, we decided to monitor arthropod visits before, during and after blooming, to establish which species flowering trees attract. The overall abundance of arthropods greatly increased during flowering. In particular, all adult beetles and all bees increased in abundance, but only a few of the flies and a single arachnid did so. We saw 66 insects on female flowers, hence quantitatively documenting for the first time insect pollination in chestnuts. Beetles, which represented 52% of all insects seen on flowering chestnut trees, increased their share to 77% on female flowers, suggesting that they represent the main pollinators of chestnut, as already proposed by Porsch (1950). Many of these flower-visiting beetles are hairy and covered with chestnut pollen. To confirm that

these insects can indeed pollinate chestnuts, experimental approaches could be used in future investigations (e.g. Chifflet et al. 2011). In our study site, the red soldier beetle was particularly abundant on flowering chestnuts. However, we surveyed pollination in a single season, in 2019, and at a single site. The results may thus reflect seasonal and spatial stochasticity in pollinator assemblages. In fact, we found that another beetle, the sulphur beetle, was the most abundant insect on flowering chestnuts in another locality located just 20 km away. In Austria, Porsch (1950) also noted that the most abundant beetle species on flowering chestnuts differed across localities.

Interestingly, in chestnut, female flowers look like male flowers of male-fertile trees. The clustered styles evoke a piece of male catkin with erect stamens, suggesting automimicry, i.e. imitation of male flowers by female flowers to attract pollinating insects searching for rewarding male flowers (Willson and Ågren 1989). The case for intersexual mimicry is stronger when the structures of one sex are modified to resemble non-homologous structures of the other sex (Bawa 1980; Dukas 1987; Willson and Ågren 1989). This is clearly the case in chestnut. A prerequisite of mimicry systems, the rarity of the mimic in comparison to the model, also applies: the male-to-female ratio is very large, over 2000 when expressed in terms of surface accessible to insects. Automimicry in plants was discovered relatively recently (Gilbert 1975; Baker 1976; Bawa 1977), so early students of chestnut pollination had no reference to look for it. Automimicry is in fact quite common in plants, especially in diclinous species. For instance, Lunau et al. (2017) identified 124 cases of stamen-like pistils in the Alpine flora (10% of the species). Wind-pollinated species, in which male and female flowers have no selective pressure to share signals, tend to exhibit greater sexual dimorphism (Johnson and Schiestl 2016). Since the many styles of the female flowers of chestnuts represent a unique and probably derived feature (Manos et al. 2001), it would be interesting to investigate the evolution of female flowers across both insect-pollinated and wind-pollinated Fagaceae.

In contrast to beetles, bees avoid chestnut female flowers, as already noted by Giovanetti and Aronne (2011). In particular, the honeybee, the second most abundant insect visiting chestnut flowers in our study site, was observed only once on a female flower and this was clearly accidental. Honeybees discriminate better than other insects against non-rewarding female flowers (e.g. Dukas 1987). During the flowering period, a subset of insect species, including bees and

syrphid flies, neglected male-sterile chestnut trees. This suggests that pollen represents a major reward for these insect visitors. Given that male-sterile trees are at least as well if not better pollinated than male-fertile trees, these insects are likely not the main chestnut pollinators. Instead, red soldier beetles congregated in similarly great numbers on male-fertile and male-sterile trees. In the future, it would be interesting to check if this species, which disperses to relatively large distances (Rodwell et al. 2018), uses chestnut trees as rendezvous sites, as noted in other beetle-pollinated plants (Faegri and van der Pilj 1979).

Remarkably, we observed more insects on female flowers of male-sterile than of male-fertile trees even though the latter received more visits from insects. In male-sterile trees, the only flowers that look like staminate flowers are the female flowers. If insect visits to female flowers are inversely related to the local abundance of staminate male flowers, this would explain this trend. Such process could contribute to the greater fruit set of male-sterile trees (Pereira-Lorenzo and Ramos-Cabrer 2004) and hence to female maintenance in gynodioecious chestnuts, a topic worthy of further investigations.

There was nearly no overlap between the two peaks of pollen production in chestnut. In contrasts, both overlapped with the production of female flowers, supporting Hasegawa et al. (2017) view that duodichogamy may “*promote outcrossing [...] rather than prevent self-pollination*”. The extreme imbalance between the two peaks of flowering in terms of male flowers displayed and reward produced does not translate into an equally dramatic imbalance in number of insect visitors. In fact, honeybees were only twice more numerous at peak 1 than at peak 2, red soldier beetles only 50% more so and the other insects were roughly equally abundant during both peaks of pollen production. For bees and for the other beetles, abundances peaked between the two peaks. It is unclear why insects would not take more advantage of the full male bloom of chestnut trees.

Visits to female flowers were most numerous after the first pollen peak, on average about 16 days after the onset of flowering. This coincides rather well with the time of maximum stigmatic receptivity reported for chestnut (between 9 and 17 days after flowering had started, Nienstedt 1956). According to MacKay (1972), one of the strongest argument in favour of insect-pollination of chestnut is the existence of bisexual catkins. For him, they seem to be “*a device to attract insects from other trees to the mixed catkins of a given tree at the time the female flower is receptive*”. Insect visits to female flowers increase when the rewarding male catkins become relatively less abundant, suggesting that

female flowers compete with male flowers for insect visits. This would explain the greater number of visits to female flowers once the first massive pollen peak is over. Interestingly, in one of the first published reports of automimicry in plants, Bawa (1977) described a self-incompatible duodichogamous tropical tree species from the Sapindaceae family in which female flowers mimic male flowers. He argued that the low frequency of the female flowers and their appearance for only a short duration of time are critical for the mimicry system to operate, otherwise insects would readily learn to discriminate between male and female flowers.

Insect interactions with female flowers are comparatively rare in chestnut. In diclinous plant species, this is not surprising, as a single insect visit to a female flower is often sufficient to fertilize almost all available ovules (Barrett and Hough 2013). Nevertheless, we were able to document a sizable number of visits to female flowers, providing some clues on how pollination is achieved. Compared to bees, beetles tend to stay longer on the plant, wandering on catkins, leaves and branches, thereby increasing the chances that they touch female flowers. Moreover, the stiff, upright borne styles located close to rewarding male flowers present “*an ideal take-off and landing platform for flying insects*” (Zirkle 2017), especially for some beetles and flies. Such aleatory pollination mode has been termed the “mess and soil” principle of pollination to emphasize its lack of precision compared to cases where the insect deposits the pollen in small amounts on a specific receptive area of the plant (Faegri and van der Pijl 1979). However, we also saw beetles licking the tip of the styles, giving some credence to the proposal that the stigmatic secretion could represent a small reward for some insects (Porsch 1950).

In view of the rarity of insect visits to chestnut female flowers, an extended period of receptivity of female flowers could help secure pollination (Schoen and Ashman 1995). In line with this prediction, female chestnut flowers possess 6-8 styles that are successively receptive for about two days each, resulting in a long overall receptivity period (Feijo et al. 1999). This system, combined with a delayed fertilization of about six weeks due to the retarded development of ovules, provides an opportunity for all pollen tubes to fertilize the ovules regardless of their times of arrival on the stigmas (Fan et al. 2015). This should maximize the chances that outcross pollen fertilizes at least one ovule from each female flower. For this to happen, insects must carry enough compatible pollen. Hasegawa et al. (2015) have investigated pollen diversity on the bodies of insects visiting *C. crenata*, using single pollen genotyping. They

found that all insects carry loads of pollen, with outcross-pollen rate being highest in bumblebees (66%), followed by small bees (35%), flies (31%), and small beetles (18%). However, our own results indicate that some of these insects, including bumblebees and honeybees, seldom visit female flowers, so their pollen load is irrelevant for pollination.

No reproductive trait of chestnut unambiguously and exclusively points towards wind pollination. In particular, chestnut pollen grains, which are much smaller than those of related wind-pollinated Fagaceae and of most other wind-pollinated plants, are probably too small for effective capture in the air by stigmatic surfaces (Whitehead 1983). In contrast, their small size increases the odds that the legs and mouthparts of insects likely to encounter the tiny stigmas will bear at least some pollen grains. Hence, we should not consider massive pollen production and apparent wastage as the exclusive prerogative of wind-pollinated plants. Convergence caused by high uncertainty of pollen delivery could explain the superficial similarity between wind- and beetle-pollination syndromes. Under this logic, the low settling velocity and long-distance dispersal potential of the chestnut pollen grains in the air should not be interpreted as direct adaptation to wind pollination, just as nutritive pollen actively collected by insects is not proof for insect pollination in oaks (Manos et al. 2001; Oh and Manos 2008; Saunders 2018).

A growing number of cases of ambophily have been reported in recent years (reviewed in Culley et al. 2002; Friedman and Barrett 2009). This is surprising, as Stebbins (1970) most effective pollinator principle states that plants should evolve to increase the efficiency of their main pollinating agent. In studying potentially ambophilous species, one should go beyond the mere realization that both animals and air bring pollen to the stigma. Instead, one should try to establish if the plant is indeed adapted to both pollination agents. To date, it is still unclear whether ambophily can be an evolutionarily stable strategy (Friedman and Barrett 2009). In the case of chestnuts, all well-performed insect-exclusion experiments have shown that insects play a major role for pollination, even in conditions favouring wind pollination. This leaves little room for the evolution of wind-pollinated traits. In the future, to demonstrate that chestnuts are ambophilous rather than entomophilous, one would need to search for traits favouring wind pollination that have evolved across species or populations in response to environmental gradients favouring this mode of pollen dispersal. Until then, we argue that the intuition of Thomas Meehan was correct (Meehan 1879) and that chestnuts ought to be considered as one

of the most important insect-pollinated forest tree species in the northern hemisphere.

## ACKNOWLEDGEMENTS:

This paper is part of the PhD of CL. We thank C. Robin and T. Barreneche for their encouragements to explore the pollination biology of this fascinating tree. These experiments would not have been possible without the maintenance of the orchards by the Invenio team in Douville (24), the INRAE experimental unit (UE1442 Vignes Bordeaux) in Villenave d'Ornon (33), and X. Capdevielle of UMR Biogeco. For the netting experiment, we thank S. Cavaignac, N. Lebarbier, M. Mouravy, C. Gauthier, and all the staff who helped us count the fruits. For insect monitoring, we thank our Biogeco colleagues I. Van Halder, who shared her expertise on insect ecology and helped monitor insect visitors in the field, and P. Chaumeil and F. Ehrenmann, who created the photo library and the associated database. We also thank M.-L. Benot and V. Fiévet for helpful discussions and advices as well as all colleagues that have helped with observations and granted access to facilities and equipment (D. Bert, M. Martin-Clotté, H. Christmann, B. Dencausse, C. Lalanne, Y. Mellerin, G. Saint-Jean, M. Trillat). We are grateful to the colleagues of the GDR Pollineco for great discussions and for B. Vaissières for advices, for pointing useful references and for critically reading and commenting the paper. We are pleased to acknowledge the help and support of the colleagues managing the citizen science program Spipoll, C. Fontaine (MNHN) and M. de Flores (OPIE). We are also very grateful to all "spipolliens" that contributed new observations on chestnut insect visitors following our request. Even if not directly used here, the data was very helpful when designing the study. We are indebted to our colleague J. Fernández-López from Centro de Investigación Forestal de Lourizán (Galicia, Spain) for sharing her deep knowledge of chestnut ecology and genetics and for guiding us in one of the last natural chestnut forest in Galicia. Comments from two reviewers helped improved the manuscript. Finally, we are pleased to acknowledge the great support of our undergraduate students T. Menthonnex and J. Bonnier who measured thousands of catkins and flowers last spring, under conditions complicated by the Covid crisis.

## FUNDING:

This work was supported by the ANRT funding under CIFRE PhD program to CL. Financial support to Invenio for this project was provided by the Regional Council of Nouvelle Aquitaine.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS:

CL performed all insect isolation experiments with Invenio staff in 2019. GB, RJP and CL surveyed insect visitors in 2019, GB established the photo library and performed all insect identifications from the photographs, EA and RJP carried out the measures of flower abundance with the help of two students from Bordeaux University, Julien Bonnier and Tanguy Menthonnex. RJP compiled information on chestnut's pollination syndrome. CL and EA performed the statistical analyses, CL designed the figures in R. RJP and CL wrote the paper, with inputs from the other authors. Photographs of Figure 3 are by CL and all others are by RJP.

## REFERENCES

- Abrol, D.P., 2015. Nuts. In: D.P. Abrol, ed. *Pollination Biology, Vol.1: Pests and pollinators of fruit crops*. Cham: Springer International Publishing, 177–207.
- Baker, H.G., 1976. "Mistake pollination" as a reproductive system with special reference to the Caricaceae. In: J. Burley and B. T. Styles, eds. *Tropical Trees: Variation, Breeding and Conservation*. Academic Press, London, 161–169.
- Baker, H.G., Baker, I., 1983. Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: C.E. Jones and R.J. Little, eds. *Handbook of Experimental Pollination Biology*. Scientific and Academic Editions, New York, 117–141.
- Barrett, S.C.H. and Hough, J., 2013. Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany*, 64 (1), 67–82.
- Bartomeus, I., Potts, S.G., Steffan-Dewenter, I., Vaissière, B.E., Woyciechowski, M., Krewenka, K.M., Tscheulin, T., Roberts, S.P.M., Szentgyörgyi, H., Westphal, C., and Bommarco, R., 2014. Contribution of insect pollinators to crop yield and quality varies with agricultural intensification. *PeerJ* 2:e328.
- Bastl, K., Bastl, M., Dirr, L., Berger, M., and Berger, U., 2020. Frequency and distribution of insect pollinated pollen in air samples of Hirst-type volumetric pollen and spore traps in Austria from 2008 to 2017. *Grana*, 59 (1), 58–70.
- Baude, M., Kunin, W. E., Boatman, N. D., Conyers, S., Davies, N., Gillespie, M. A., Morton, R. D., Smart, S. M., and Memmott, J., 2016. Historical nectar assessment reveals the fall and rise of floral resources in Britain. *Nature*, 530(7588), 85–88.

- Bawa, K.S., 1977. The reproductive biology of *Cupania guatemalensis* Radlk. (Sapindaceae). *Evolution*, 31 (1), 52–63.
- Bawa, K.S., 1980. Mimicry of male by female flowers and intrasexual competition for pollinators in *Jacaratia dolichaula* (D. Smith) Woodson (Caricaceae). *Evolution*, 34 (3), 467–474.
- Boavida, L.C., Varela, M.C., and Feijó, J.A., 1999. Sexual reproduction in the cork oak (*Quercus suber* L.). I. The progamic phase. *Sexual Plant Reproduction*, 11 (6), 347–353.
- Brittain, C., Williams, N., Kremen, C., Klein, A. M., 2013. Synergistic effects of non-*Apis* bees and honey bees for pollination services. *Proceedings of the Royal Society B* 280 (1754), 20122767.
- Cannon, C.H., 2001. Morphological and molecular diversity in *Lithocarpus* (Fagaceae) of Mount Kinabalu. *Sabah Parks Nature Journal*, 4, 45–69.
- Chifflet, R., Klein, E.K., Lavigne, C., Le Féon, V., Ricroch, A.E., Lecomte, J., Vaissière, B.E., 2011. Spatial scale of insect-mediated pollen dispersal in oilseed rape in an open agricultural landscape. *Journal of Applied Ecology*, 48, 689–696.
- Clapper, R.B., 1954. Chestnut breeding, techniques and results. I. Breeding material and pollination techniques. *The Journal of Heredity*, 45 (3), 107–114.
- Conedera, M., Krebs, P., Tinner, W., Pradella, M., and Torriani, D., 2004. The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. *Vegetation History and Archaeobotany*, 13 (3), 161–179.
- Conedera, M., Tinner, W., Crameri, S., Torriani, D., and Herold, A., 2006. Taxon-related pollen source areas for lake basins in the southern Alps: an empirical approach. *Vegetation History and Archaeobotany*, 15 (4), 263–272.
- Conedera, M., Tinner, W., Krebs, P., de Rigo, D., and Caudullo, G., 2016. *Castanea sativa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: J. San-Miguel-Ayanz, D. de Rigo, G. Caudullo, T. Houston Durrant, and A. Mauri, eds. *European Atlas of Forest Tree Species*. Luxembourg: Publication Office of the European Union, 78–79.
- Cruden, R.W., 2000. Pollen grains: why so many? *Plant Systematics and Evolution*, 222 (1), 143–165.
- Culley, T.M., Weller, S.G., and Sakai, A.K., 2002. The evolution of wind pollination in angiosperms. *Trends in Ecology and Evolution*, 17 (8), 361–369.
- Deguines, N., Julliard, R., de Flores, M., and Fontaine, C., 2012. The whereabouts of flower visitors: contrasting land-use preferences revealed by a country-wide survey based on citizen science. *PLoS ONE*, 7 (9), e45822.
- Dellinger, A.S., 2020. Pollination syndromes in the 21st century: where do we stand and where may we go? *New Phytologist*, doi:10.1111/nph.16793
- Delpino, F., 1868–1874. *Ulteriori osservazioni sulla dicogamia nel regno vegetale*. Buchausgabe, Milano.
- Diethart, B. and Bouchal, J., 2018. *Quercus robur* [online]. Available from: [https://paldat.testsyst.info/pub/Quercus\\_robur/303\\_318](https://paldat.testsyst.info/pub/Quercus_robur/303_318) [Accessed 4 Sep 2020].
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunges, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., ... and Alaux, C. 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?. *PloS one*, 8(8), e72016.
- Dukas, R., 1987. Foraging behavior of three bee species in a natural mimicry system: female flowers which mimic male flowers in *Echallium elaterium* (Cucurbitaceae). *Oecologia*, 74 (2), 256–263.
- Erbar, C. and Langlotz, M., 2005. Pollen to ovule ratios: standard or variation – a compilation. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 126, 71–132.
- Faegri, K. and Van Der Pijl, L., 1979. *Principles of pollination ecology*. Elsevier.
- Fan, X., Yuan, D., Tang, J., Tian, X., Zhang, L., Zou, F., and Tan, X., 2015. Sporogenesis and gametogenesis in Chinese chinquapin (*Castanea henryi* (Skam) Rehder and Wilson) and their systematic implications. *Trees*, 29 (6), 1713–1723.
- Fang, Y., Ma, C., and Bunting, M.J., 2019. Novel methods of estimating relative pollen productivity: a key parameter for reconstruction of past land cover from pollen records. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment*, 43 (6), 731–753.
- Feijó, J.A., Cortal, A.C., Boavida, L., Nerum, I.V., Valdivieso, T., Oliveira, M.M., and Broothaerts, W., 1999. Advances on the study of sexual reproduction in the cork-tree (*Quercus suber* L.), chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and in Rosaceae (apple and almond). In: M. Cresti, G. Cai, and A. Moscatelli, eds. *Fertilization in Higher Plants*. Berlin, Heidelberg: Springer, 377–396.
- Frei, T., 1997. Pollen distribution at high elevation in Switzerland: evidence for medium range transport. *Grana*, 36 (1), 34–38.

- Friedman, J. and Barrett, S.C.H., 2008. A phylogenetic analysis of the evolution of wind pollination in the angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*, 169 (1), 49–58.
- Friedman, J. and Barrett, S.C.H., 2009. Wind of change: new insights on the ecology and evolution of pollination and mating in wind-pollinated plants. *Annals of Botany*, 103 (9), 1515–1527.
- Friedman, J. and Barrett, S.C.H., 2011. The evolution of ovule number and flower size in wind-pollinated plants. *The American Naturalist*, 177 (2), 246–257.
- Gamba, D. and Muchhal, N., 2020. Global patterns of population genetic differentiation in seed plants. *Molecular Ecology*, <https://doi.org/10.1111/mec.15575>
- Ghosh, S., and Jung, C. 2017. Nutritional value of bee-collected pollens of hardy kiwi, *Actinidia arguta* (Actinidiaceae) and oak, *Quercus* sp. (Fagaceae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20, 245–251.
- Gilbert, L.E., 1975. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. In: *Coevolution of Animals and Plants: Symposium V, First International Congress of Systematic and Evolutionary Biology, 1973*. University of Texas Press, 210–240.
- Giovanetti, M. and Aronne, G., 2011. Honey bee interest in flowers with anemophilous characteristics: first notes on handling time and routine on *Fraxinus ornus* and *Castanea sativa*. *Bulletin of Insectology*, 64 (1), 77–82.
- Gottsberger, G., 1977. Some aspects of beetle pollination in the evolution of flowering plants. In: K. Kubitzki, ed. *Flowering Plants*. Vienna: Springer Vienna, 211–226.
- Grant, V., 1950. The protection of the ovules in flowering plants. *Evolution*, 4 (3), 179–201.
- Groom, P., 1909. *Trees and their life histories*. Cassell and company, London.
- Halbritter, H., Sam, S., and Buchner, R., 2016. *Castanea sativa* [online]. Available from: [https://paldat.testsyst.info/pub/Castanea\\_sativa/301\\_259](https://paldat.testsyst.info/pub/Castanea_sativa/301_259) [Accessed 4 Sep 2020].
- Hall, J.A. and Walter, G.H., 2011. Does pollen aerodynamics correlate with pollination vector? Pollen settling velocity as a test for wind versus insect pollination among cycads (Gymnospermae: Cycadaceae: Zamiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 104 (1), 75–92.
- Hall, J.A. and Walter, G.H., 2018. Pollination of the Australian cycad *Cycas ophiolitica* (Cycadaceae): the limited role of wind pollination in a cycad with beetle pollinator mutualists, and its ecological significance. *Journal of Tropical Ecology*, 34 (2), 121–134.
- Hasegawa, Y., Suyama, Y., and Seiwa, K., 2009. Pollen donor composition during the early phases of reproduction revealed by DNA genotyping of pollen grains and seeds of *Castanea crenata*. *New Phytologist*, 182 (4), 994–1002.
- Hasegawa, Y., Suyama, Y., and Seiwa, K., 2015. Variation in pollen-donor composition among pollinators in an entomophilous tree species, *Castanea crenata*, revealed by single-pollen genotyping. *Plos One*, 10 (3), e0120393.
- Hasegawa, Y., Suyama, Y., and Seiwa, K., 2017. Flowering phenology of a duodichogamous self-incompatible tree species, *Castanea crenata*. *Japanese Journal of Ecology*, 67 (1), 31–39.
- Henderson, A., 1986. A review of pollination studies in the Palmae. *The Botanical Review*, 52 (3), 221–259.
- Hesse, M., 1978. Entwicklungsgeschichte und Ultrastruktur von Pollenkitt und Exine bei nahe verwandten entomophilen und anemophilen Angiospermensippen: Ranunculaceae, Hamamelidaceae, Platanaceae und Fagaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 130 (1), 13–42.
- Jiang, F., Xu, Q., Zhang, S., Li, F., Zhang, K., Wang, M., Shen, W., Sun, Y., and Zhou, Z., 2020. Relative pollen productivities of the major plant taxa of subtropical evergreen–deciduous mixed woodland in China. *Journal of Quaternary Science*, 35 (4), 526–538.
- Johnson, G.P., 1988. Revision of *Castanea* sect *Balanocastanon* (Fagaceae). *Journal of the Arnold Arboretum*, 69 (1), 25–49.
- Johnson, S.D. and Schiestl, F.P., 2016. *Floral mimicry*. Oxford University Press.
- Kaul, R.B., 1986. Evolution and reproductive biology of inflorescences in *Lithocarpus*, *Castanopsis*, *Castanea*, and *Quercus* (Fagaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 73 (2), 284–296.
- Kim, Y.K. Lee, S. Song, J.H. Kim, M.J. Yunusbaev, U., Lee, M.-L., Kim, M.S., Kwon, H.W., 2020. Comparison of biochemical constituents and contents in floral nectar of *Castanea* spp.. *Molecules* 2020, 25, 4225.
- Kiyonaga, J., 1991. Production rate of *Quercus serrata* pollen grains in a secondary *Quercus serrata* forest. *Geographical Reports of Tokyo Metropolitan University*, (26), 219–226.

- Kiyonaga, J., 1995. Production rate of pollen grains of *Castanea crenata* in a *Quercus serrata* secondary forest. *Geographical Reports of Tokyo Metropolitan University*, (30), 80–88.
- Klein, E.K., Lagache-Navarro, L., and Petit, R.J., 2017. Demographic and spatial determinants of hybridization rate. *Journal of Ecology*, 105 (1), 29–38.
- Larue, C., Barreneche, T., and Petit, R.J., 2020. Efficient monitoring of phenology in chestnuts. *Scientia Horticulturae*, in revision.
- López-Sáez, J.A., Glais, A., Robles-López, S., Alba-Sánchez, F., Pérez-Díaz, S., Abel-Schaad, D., and Luelmo-Lautenschlaeger, R., 2017. Unraveling the naturalness of sweet chestnut forests (*Castanea sativa* Mill.) in central Spain. *Vegetation History and Archaeobotany*, 26 (2), 167–182.
- Lunau, K., Konzmann, S., Winter, L., Kamphausen, V., and Ren, Z.-X., 2017. Pollen and stamen mimicry: the alpine flora as a case study. *Arthropod-Plant Interactions*, 11 (3), 427–447.
- Mangla, Y. and Gupta, K., 2015. Love in the air: wind pollination ecological and evolutionary considerations. In: *Plant Reproductive Biology and Conservation*, International Publishing House, New Delhi. 234–245.
- Manino, A., Patetta, A., and Marletto, F., 1991. Investigations on chestnut pollination. *Acta Horticulturae*, 288, 335–339.
- Manos, P.S., Cannon, C.H., and Oh, S.-H., 2008. Phylogenetic relationships and taxonomic status of the paleoendemic Fagaceae of Western North America: recognition of a new genus, *Notholithocarpus*. *Madroño*, 55 (3), 181–190.
- Manos, P.S., Zhou, Z., and Cannon, C.H., 2001. Systematics of Fagaceae: phylogenetic tests of reproductive trait evolution. *International Journal of Plant Sciences*, 162 (6), 1361–1379.
- Martín, M.A., Mattioni, C., Molina, J.R., Alvarez, J.B., Cherubini, M., Herrera, M.A., Villani, F., and Martín, L.M., 2012. Landscape genetic structure of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Spain. *Tree Genetics and Genomes*, 8 (1), 127–136.
- Mattioni, C., Cherubini, M., Micheli, E., Villani, F., and Bucci, G., 2008. Role of domestication in shaping *Castanea sativa* genetic variation in Europe. *Tree Genetics and Genomes*, 4 (3), 563–574.
- McKay, J.W., 1972. Pollination of chestnut by honey bees. *Northern Nut Growers Ass Annu Rep*, (63), 83–86.
- Meehan, T., 1879. On sex in *Castanea americana*. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 31 (2), 165–167.
- Mert, C. and Soylu, A., 2006. Flower and stamen structures of male-fertile and male-sterile chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131 (6), 752–759.
- Michaud, H., Toumi, L., Lumaret, R., Li, T.X., Romane, F., and Di Giusto, F., 1995. Effect of geographical discontinuity on genetic variation in *Quercus ilex* L. (holm oak). Evidence from enzyme polymorphism. *Heredity*, 74 (6), 590–606.
- Millerón, M., López de Heredia, U., Lorenzo, Z., Perea, R., Dounavi, A., Alonso, J., Gil, L., and Nanos, N., 2012. Effect of canopy closure on pollen dispersal in a wind-pollinated species (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Ecology*, 213 (11), 1715–1728.
- Molina, R.T., Rodríguez, A.M., Palaciso, I.S., and López, F.G., 1996. Pollen production in anemophilous trees. *Grana*, 35 (1), 38–46.
- Nakamura, M., 1992. Structure of stigma and germination of pollen in Japanese chestnut (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 61 (2), 295–302.
- Nienstaedt, H., 1956. Receptivity of the pistillate flowers and pollen germination tests in genus *Castanea*. *Silvae Genetica*, 5, 40–45.
- Oh, S.-H. and Manos, P.S., 2008. Molecular phylogenetics and cupule evolution in Fagaceae as inferred from nuclear CRABS CLAW sequences. *Taxon*, 57 (2), 434–451.
- de Oliveira, D., Gomes, A., Ilharco, F.A., Manteigas, A.M., Pinto, J., and Ramalho, J., 2001. Importance of insect pollinators for the production in the chestnut, *Castanea sativa*. *Acta Horticulturae*, 561, 269–273.
- Paillet, F.L., Winkler, M.G., and Sanford, P.R., 1991. Relationship between pollen frequency in moss polsters and forest composition in a naturalized stand of American chestnut: implications for paleoenvironmental interpretation. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 118 (4), 432–443.
- Peeters, A.G. and Zoller, H., 1988. Long range transport of *Castanea sativa* pollen. *Grana*, 27 (3), 203–207.
- Pereira-Lorenzo, S., Ballester, A., Corredoira, E., Vieitez, A.M., Agnanostakis, S., Costa, R., Bounous, G., Botta, R., Beccaro, G.L., Kubisiak, T.L., Conedera, M., Krebs, P., Yamamoto, T., Sawamura, Y., Takada, N., Gomes-Laranjo, J., and Ramos-Cabrera, A.M., 2012. Chestnut. In: M.L. Badenes and D.H. Byrne, eds.

- Fruit Breeding*. Boston, MA: Springer US, 729–769.
- Pereira-Lorenzo, S., Costa, R., Anagnostakis, S., Serdar, U., Yamamoto, T., Saito, T., Ramos-Cabrera, A.M., Ling, Q., Barreneche, T., Robin, C., Botta, R., Contessa, C., Conedera, M., Martín, L.M., Martín, A., Gomes-Laranjo, J., Villani, F., and Carlson, J.E., 2017. Interspecific hybridization of chestnut. In: *Polyplodiy and Hybridization for Crop Improvement*. CRC Press, 377–407.
- Pereira-Lorenzo, S. and Ramos-Cabrera, A.M., 2004. Chestnut, an ancient crop with future. In: R. Dris and S.M. Jain, eds. *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops Volume 1: Preharvest Practice*. Dordrecht: Springer Netherlands, 105–161.
- Pereira-Lorenzo, S., Ramos-Cabrera, A.M., Barreneche, T., Mattioni, C., Villani, F., Díaz-Hernández, B., Martín, L.M., Robles-Loma, A., Cáceres, Y., and Martín, A., 2019. Instant domestication process of European chestnut cultivars. *Annals of Applied Biology*, 174 (1), 74–85.
- Petit, R.J., Bodénès, C., Ducouso, A., Roussel, G., and Kremer, A., 2003. Hybridization as a mechanism of invasion in oaks: research review. *New Phytologist*, 161 (1), 151–164.
- Pierre, J., Vaissiere, B., Vallée, P., and Renard, M., 2010. Efficiency of airborne pollen released by honeybee foraging on pollination in oilseed rape: a wind insect-assisted pollination. *Apidologie*, 41 (1), 109–115.
- Pitte, J.R., 2014. Terres de Castanide : hommes et paysages du châtaignier de l'Antiquité à nos jours. Fayard.
- Porsch, O., 1950. Geschichtliche Lebenswertung der Kastanienblüte. *Österreichische botanische Zeitschrift*, 97 (3–5), 269–321.
- Proctor, M., Yeo, P.F., Yeo, P., and Lack, A., 1996. *The natural history of pollination*. Timber Press.
- Ramsay, G., Thompson, C., and Squire, G., 2003. *Quantifying landscape-scale gene flow in oilseed Rape*. Department for Environment, Food and Rural Affairs.
- Rech, A.R., Dalsgaard, B., Sandel, B., Sonne, J., Svenning, J.-C., Holmes, N., and Ollerton, J., 2016. The macroecology of animal versus wind pollination: ecological factors are more important than historical climate stability. *Plant Ecology and Diversity*, 9 (3), 253–262.
- Renner, S.S., 2014. The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. *American Journal of Botany*, 101 (10), 1588–1596.
- Rodwell, L.E., Day, J.J., Foster, C.W., and Holloway, G.J., 2018. Daily survival and dispersal of adult *Rhagonycha fulva* (Coleoptera: Cantharidae) in a wooded agricultural landscape. *European Journal of Entomology*, 115, 432–436.
- Rosas-Guerrero, V., Aguilar, R., Martén-Rodríguez, S., Ashworth, L., Lopezaraiza-Mikel, M., Bastida, J.M., and Quesada, M., 2014. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecology Letters*, 17 (3), 388–400.
- Sabugosa-Madeira, B., Ribeiro, H., Cunha, M., and Abreu, I., 2008. Anemophilous and entomophilous pollen flows of *Castanea sativa* in the northeast of Portugal. *Acta Horticulturae*, 784, 133–136.
- Sargent, R.D. and Otto, S.P., 2004. A phylogenetic analysis of pollination mode and the evolution of dichogamy in angiosperms. *Evolutionary Ecology Research*, 6, 1183–1199.
- Saunders, M.E., 2018. Insect pollinators collect pollen from wind-pollinated plants: implications for pollination ecology and sustainable agriculture. *Insect Conservation and Diversity*, 11, 13–31.
- Schermer, É., Bel-Venner, M., Fouquet, D., Siberchicot, A., Boulanger, V., Caillard, T., Thibaudon, M., Oliver, G., Nicolas, M., Gaillard, J., Delzon, S., and Venner, S., 2019. Pollen limitation as a main driver of fruiting dynamics in oak populations. *Ecology Letters*, 22 (1), 98–107.
- Schoen, D.J. and Ashman, T.-L., 1995. The evolution of floral longevity: resource allocation to maintenance versus construction of repeated parts in modular organisms. *Evolution*, 49 (1), 131–139.
- Shi, Z. and Stösser, R., 2005. Reproductive biology of Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume). *European Journal of Horticultural Science*, 70 (2), 96–103.
- Sisco, P.H., Neel, T.C., Hebard, F.V., Craddock, J.H., and Shaw, J., 2014. Cytoplasmic male sterility in interspecific hybrids between American and Asian *Castanea* species is correlated with the American D chloroplast haplotype. *Acta Horticulturae*, 1019, 215–222.
- Sprengel, C.K. 1811. *Die Nützlichkeit der Bienen und die Notwendigkeit der Bienenzucht, von einer neuen Seite dargestellt*. Reprint (A. Krause, ed.) by F. Pfenningsdorff, Berlin, 1918.

- Stanley, R.G. and Linskens, H.F., 1974. *Pollen: biology biochemistry management*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Stebbins, G.L., 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1 (1), 307–326.
- Stout A.B., 1926. Why are chestnuts self-fruitless? *Journal of New York Botanical Garden* 27, 154–158.
- Stout A.B., 1928. Dichogamy in flowering plants. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 55, 141–153.
- Strelin, M.M., Sazatornil, F., Benitez-Vieyra, S., and Ordano, M., 2016. Bee, hummingbird, or mixed-pollinated *Salvia* species mirror pathways to pollination optimization: a morphometric analysis based on the Pareto front concept. *Botany*, 95 (2), 139–146.
- Tampieri, F., Mandrioli, P., and Puppi, G.L., 1977. Medium range transport of airborne pollen. *Agricultural Meteorology*, 18 (1), 9–20.
- Tasei, J. N., and Aupinel, P. 2008. Nutritive value of 15 single pollens and pollen mixes tested on larvae produced by bumblebee workers (*Bombus terrestris*, Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 39, 397–409.
- Thurm, E.A., Hernandez, L., Baltensweiler, A., Ayan, S., Rasztovits, E., Bielak, K., Zlatanov, T.M., Hladnik, D., Balic, B., Freudenschuss, A., Büchsenmeister, R., and Falk, W., 2018. Alternative tree species under climate warming in managed European forests. *Forest Ecology and Management*, 430, 485–497.
- Timerman, D. and Barrett, S.C.H., 2020. Influence of local density and sex ratio on pollination in an ambophilous flowering plant. *American Journal of Botany*, 107 (4), 587–598.
- Toumi, L. and Lumaret, R., 1998. Allozyme variation in cork oak (*Quercus suber* L.): the role of phylogeography and genetic introgression by other Mediterranean oak species and human activities. *Theoretical and Applied Genetics*, 97 (4), 647–656.
- Villani, F., Sansotta, A., Cherubini, M., Cesaroni, D., Sbordoni, V., 1999. Genetic structure of natural populations of *Castanea sativa* in Turkey: evidence of a hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology*, 12 (2), 233–244.
- Waser, N.M., Chittka, L., Price, M.V., Williams, N.M., and Ollerton, J., 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, 77 (4), 1043–1060.
- Whitehead, D.R., 1983. Wind pollination: some ecological and evolutionary perspectives. In: L. Real, ed. *Pollination Biology*. Academic Press, 97–108.
- Willson, M.F. and Ågren, J., 1989. Differential floral rewards and pollination by deceit in unisexual flowers. *Oikos*, 55 (1), 23–29.
- Wright, J.W. and Dodd, R.S., 2013. Could tanoak mortality affect insect biodiversity? Evidence for insect pollination in tanoaks. *Madroño*, 60 (2), 87–94.
- Xiong, H., Zou, F., Guo, S., Yuan, D., and Niu, G., 2019. Self-sterility may be due to prezygotic late-acting self-incompatibility and early-acting inbreeding depression in Chinese chestnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 144 (3), 172–181.
- Zhang, X., Ji, Y., Zhang, Y., Liu, F., Chen, H., Liu, J., Handberg, E.S., Chagovets, V.V., and Chingin, K., 2019. Molecular analysis of semen-like odor emitted by chestnut flowers using neutral desorption extractive atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411 (18), 4103–4112.
- Zhong, W., Zhu, Z., Ouyang, F., Qiu, Q., Fan, X., and Yuan, D., 2020. A cytological study of anther and pollen development in chinquapin (*Castanea henryi*). *HortScience*, 55 (6), 945–950.
- Zirkle, C., 2017. The effect of insects on seed set of Ozark chinquapin, *Castanea ozarkensis*. Master Thesis. University of Arkansas.

# Le rôle crucial des insectes dans la pollinisation du châtaignier est confirmé

## INTRODUCTION

L'idée d'une pollinisation principalement anémophile du châtaignier est solidement ancrée : en effet, le pollen de châtaignier, de petite taille et produit en grande quantité, est transporté par le vent sur de longues distances, au point de causer des allergies (Astray et al. 2016). Cela rend la proposition d'une pollinisation par les insectes de cet arbre particulièrement contre-intuitive. Convaincre scientifiques et agriculteurs de remettre en cause leur conception sera donc difficile. Pour illustrer ce point, il suffit de considérer les récentes études comparatives évaluant l'effet du mode de pollinisation des plantes sur différentes fonctions biologiques. Elles classent toutes le châtaignier parmi les espèces anémophiles. Par exemple, Bastl et al. (2020), dans une étude d'aérobiologie destinée aux allergologues menée en Autriche avec des capteurs de pollen, comparent 39 plantes pollinisées par les insectes avec 43 plantes pollinisées par le vent, parmi lesquelles ils classent le châtaignier. Ils trouvent que le pollen des espèces pollinisées par le vent est plus abondant et dispersé plus précocement dans la saison. Du coup, le châtaignier, qui fleurit tardivement, constitue une exception parmi les espèces qu'ils considèrent comme anémophiles. De même, Garcia et al. (2021) ont analysé les données de la FAO (1961–2018) sur le rendement de différentes plantes pérennes cultivées à production alternée. Ils comparent 6 espèces considérées comme anémophiles (dont le châtaignier) et 21 considérées comme entomophiles, et montrent une autocorrélation plus négative avec le rendement de l'année précédente ainsi qu'un plus fort coefficient de variation pour les espèces pollinisées par le vent que pour celles pollinisées par les insectes. Là aussi, le châtaignier apparaît comme une exception à la tendance générale des espèces classées comme étant anémophiles. Deguines et al. (2014) avaient montré, en utilisant également des données pluriannuelles de rendement pour 54 espèces de plantes cultivées en France, que les bénéfices de l'agriculture intensive diminuent chez les espèces dépendant le plus des insectes pollinisateurs. Leur classification du mode de pollinisation était plus nuancée que dans les deux travaux cités plus haut, mais le châtaignier était là aussi considéré comme principalement pollinisé par le vent (index de dépendance à ce mode de pollinisation de 75 %, contre 25 % pour la dispersion par les insectes).

Après avoir mené en 2019 une première expérience d'exclusion d'insectes à l'aide de filets dans le verger d'Invenio à Douville (24), dont les résultats ont été publiés début 2021 (Larue et al. 2021a), nous avons reçu beaucoup de retours positifs mais aussi quelques critiques sur la difficulté d'interpréter l'effet des filets sur la pollinisation : les filets fins que nous avions utilisés, pourtant recommandés par le fabricant pour les études sur la pollinisation, bloquaient non seulement les insectes mais également en partie le

pollen transporté par le vent, sous-estimant ainsi le rôle de ce vecteur. Nous avons donc poursuivi les expérimentations, d'une part pour disposer de résultats sur un autre site et pour d'autres années, et d'autre part pour tester d'autres modalités d'exclusion sélective des insectes.

## MATERIELS ET METHODES

Dans la parcelle A de la collection INRAE de châtaignier à Villenave d'Ornon (Larue et al. 2021b), nous avons sélectionné cinq arbres en 2020 : A42J et A44Qs ('Marigoule', longistaminé), A45E ('Merle', astaminé), A55S ('Vignols', longistaminé), A58Os ('Bouche de Bétizac', astaminé). Nous avons de nouveau étudié cinq arbres en 2021, trois nouveaux : A60Qs ('Maridonne', longistaminé), A66Qs ('Marlhac', mésostaminé), A71Rs ('Marsol', longistaminé) et deux déjà utilisés l'année précédente (A45E et A58Os), en laissant de côté les arbres identifiés en 2020 comme étant moins bien pollinisés et donc moins informatifs pour ces expériences.

En 2020, nous avons identifié et installé sur chaque arbre avant que les fleurs femelles ne deviennent réceptives :

- 10 branches témoins, laissées en pollinisation ouverte ;
- 20 branches entourées de filets fins (mailles de  $700\text{ }\mu\text{m} \times 400\text{ }\mu\text{m}$ ) ; ces filets (Diatex F550P, <https://www.diatex.com/fr/diatex-produit/f510/>), recommandés pour l'étude de la pollinisation, sont les mêmes que ceux utilisés en 2019 (Larue et al. 2021a). Ils ont une perméabilité sous  $200\text{ Pa} > 15000\text{ l/m}^2/\text{s}$  et des mailles bien plus larges que le pollen de châtaignier (environ  $15\text{ }\mu\text{m} \times 11\text{ }\mu\text{m}$ ).
- 10 branches entourées de filets horticole anti-insectes à mailles très larges ( $2\text{ mm} \times 6\text{ mm}$ ).

En 2021, nous avons identifié et installé sur chaque arbre avant que les fleurs femelles ne deviennent réceptives :

- 15 branches témoins, laissées en pollinisation ouverte ;
- 15 branches entourées avec des filets à fines mailles (cf. ci-dessus) ;
- 15 branches entourées avec des filets à mailles moyennes (mailles de  $1050\text{ }\mu\text{m} \times 1050\text{ }\mu\text{m}$ ) ; ces filets (Diatex F510 ; <https://www.diatex.com/fr/diatex-produit/f510-filets-pollinisation/>), conçus spécifiquement pour l'étude de la pollinisation, laissent passer en moyenne 75 % du flux pollinique atmosphérique, selon les chiffres donnés par le fabricant ;
- 5 branches entourées avec deux filets : un filet à fines mailles recouvert d'un filet horticole anti-insectes à mailles larges ;
- 5 branches entourées avec deux filets : un filet à mailles moyennes recouvert d'un filet horticole anti-insectes à mailles larges.

Nous avons à l'automne compté pour chaque branche les bogues et les fruits présents et calculé les taux de remplissages des bogues, en divisant le nombre de fruits pleins par le nombre de fruits total (fruits pleins + fruits vides).

## RESULTATS

Le taux de remplissage moyen des bogues témoins était de 40 % en 2020 et 47 % en 2021. Les filets à grosses mailles et à mailles moyennes n'étaient pas adaptés : dans le premier cas, certains insectes (comme le téléphore fauve) pouvaient rentrer, et dans les deux cas, les styles effilés et érigés des inflorescences femelles dépassaient régulièrement des filets et pouvaient donc être visités par des insectes posés à l'extérieur du filet (figure 1). Néanmoins, les résultats indiquent qu'ils gardent une certaine efficacité, en empêchant les insectes d'accéder au moins à certaines fleurs : avec les grosses mailles, le taux de remplissage chute de 63 % par rapport au témoin ; avec les mailles moyennes, la diminution est de 72 %. Avec le filet le plus fin, la diminution par rapport au témoin était de 93 % en 2019 et de 87 % en 2020. En combinant deux filets, la réduction allait de 90 % à 94 % (tableau 1 et figure 2).

*Table 1 : Taux de remplissage des bogues selon le traitement utilisé (témoin ou filets)*

Arbres	Témoin	Gros	Moyen	Fin	Moyen + Gros	Fin +Gros
A58Os <sup>1</sup>	89 % (31) <sup>2</sup>	49 % (19)	/	5 % (39)	/	/
A42J	8 % (41)	4 % (25)	/	1 % (56)	/	/
A44Qs	30 % (11)	11 % (29)	/	4 % (60)	/	/
A55S	28 % (25)	2 % (16)	/	2 % (63)	/	/
A45E	42 % (11)	6 % (47)	/	1 % (105)	/	/
Moyenne	40 % (119)	15 % (136)	/	2 % (323)	/	/
A58Os <sup>3</sup>	87 % (35)	/	11 % (51)	9 % (35)	6 % (6)	0 % (11)
A60Qs	30 % (59)	/	8 % (62)	1 % (75)	0 % (4)	4 % (16)
A66Qs	66 % (129)	/	22 % (139)	6 % (124)	5 % (49)	6 % (57)
A71Rs	22 % (30)	/	9 % (42)	7 % (67)	9 % (15)	3 % (11)
A45E	31 % (26)	/	16 % (60)	8 % (65)	5 % (14)	0 % (15)
Moyenne	47 % (279)	/	13 % (354)	6 % (366)	5 % (88)	3 % (110)

<sup>1</sup> Les résultats pour l'année 2020 sont indiqués dans la partie haute du tableau

<sup>2</sup> Le nombre de bogues est indiqué entre parenthèses après le taux de remplissage

<sup>3</sup> Les résultats pour l'année 2021 sont indiqués dans la partie basse du tableau

## DISCUSSION

Même avec des filets inadaptés car à mailles trop grandes et laissant passer les insectes ou les styles des fleurs, le taux de remplissage est divisé par 3 ou 4 par rapport au témoin. Ces filets laissent passer au



Figure 1 : Les stigmates fins et effilés des fleurs femelles souvent en position érigée dépassent des filets (ici un filet avec une maille standard de 1 mm × 1 mm), et des insectes peuvent venir les polliniser

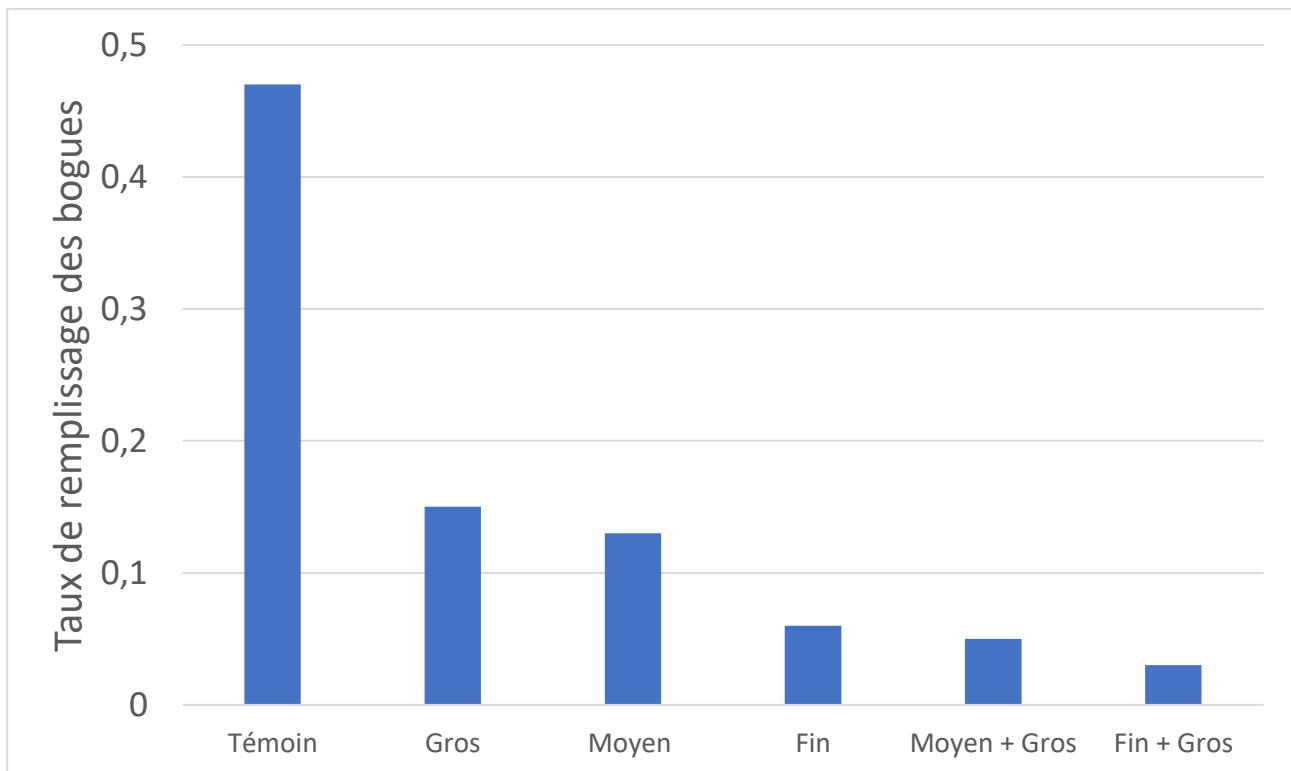


Figure 2 : Taux de remplissage des bogues en fonction des différentes tailles de mailles de filets

moins 75 % du flux pollinique atmosphérique. Cette seconde expérience conforte donc notre précédente conclusion : sans insectes pollinisateurs, la production de fruits s'effondre. Peut-on estimer la part des fleurs dont la pollinisation est attribuable au vent ?

Avec des filets qui ne présentent pas ces inconvénients, on trouve un taux de remplissage environ 10 à 20 fois plus faible que chez les témoins (le taux de remplissage ne représente que 13 % à 6 % de celui du témoin). Ce sont ces mêmes filets qui avaient été utilisés en 2019 à Douville (24) dans notre travail précédent (Larue et al. 2021a). Seule la variété ‘Bouche de Bétizac’ est commune aux deux expériences (arbre A58Os à Villenave d’Ornon). A Douville, le taux de remplissage est passé pour cette variété de 95 % pour les témoins à 13 % avec les filets ; à Villenave d’Ornon, le taux de remplissage est passé en 2020 de 89 % à 5 %, et en 2021 de 87 % à 9 %. Ainsi, ces expériences d’exclusion des insectes pollinisateurs, réalisées sur différents sites et pendant trois années consécutives, en utilisant des variétés identiques ou différentes, donnent des résultats très proches : quand les fleurs sont entourées de filets, le taux de remplissage diminue fortement.

Avec les modalités à deux filets (filet fin ou moyen associé à un filet à large maille), l'accès des insectes aux fleurs femelles est rendu encore plus difficile. On trouve donc comme c'était attendu un taux de remplissage encore plus faible par rapport à la modalité avec un seul filet fin ou moyen. La seule différence est la présence d'un filet à large mailles complètement perméable au pollen présent dans l'air. Ce résultat conforte donc le rôle crucial des insectes pour la pollinisation du châtaignier. Il est vraisemblable que même avec les filets fins, les nombreux insectes chargés de pollen marchant sur les filets puissent polliniser les fleurs érigées du châtaignier situées juste sous le filet. Cela expliquerait la diminution de plus de la moitié du taux de remplissage en rajoutant un filet à grosses mailles à un filet à plus petites mailles (le taux de remplissage passe en effet de 13 % à 5 % avec les filets moyens, et de 6 % à 3 % avec les filets fins). Ces résultats nous confortent dans l'idée que le rôle du vent dans la pollinisation du châtaignier est pratiquement négligeable, d'autant qu'une partie des graines développées présentes dans les filets pourrait être issue d'autofécondation, et que certains filets (notamment les plus fins) se déchirent parfois après avoir été posés, pouvant expliquer la présence résiduelle de fruits pleins dans les filets. Enfin, du pollen à haute concentration relargué par les insectes volant au-dessus des filets, ou posés dessus, pourrait aussi polliniser les fleurs de châtaignier (Pierre et al. 2010). L'extrême petitesse des stigmates semble en effet particulièrement inadaptée pour la capture du pollen fortement dilué dans l'air (Larue et al. 2021a).

Il est important que la communauté scientifique puisse correctement apprécier le mode de pollinisation principal du châtaignier : le genre *Castanea* est présent sur une bonne partie de l'hémisphère nord, où il occupe (ou a occupé) une place importante dans les forêts tempérées ou subtropicales. En France, le châtaignier peut être désormais considéré la première espèce forestière entomophile, voire même la

première espèce entomophile toutes espèces de plantes confondues, si on raisonne en termes de biomasse et d'abondance, loin devant les saules, les tilleuls ou les espèces d'arbres ou arbustes de la famille des rosacées (*Prunus*, *Sorbus*, *Malus*, etc.). Il représente ainsi une ressource alimentaire majeure pour de nombreux insectes sauvages ainsi que pour l'abeille domestique, d'autant qu'il a une floraison particulièrement étalée et qu'il fleurit à une période critique, au début de l'été.

Pour la production de fruits en verger, la démonstration de l'importance des insectes dans la pollinisation du châtaignier est un argument de poids pour faire évoluer les pratiques dans le sens de l'agroécologie. Il semble ainsi important que les castanéiculteurs revoient leurs itinéraires cultureaux, en diminuant le nombre de traitement phytosanitaires, notamment les insecticides, en utilisant à la place des méthodes de lutte biologique comme la confusion sexuelle à base de phéromone pour lutter contre les larves se développant dans les fruits. De plus, il faudra sans doute limiter les désherbages et les broyages inter-rangs qui laissent le sol à nu, afin que les insectes pollinisateurs et les autres auxiliaires trouvent des sites pour se reproduire et de la nourriture tout au long de l'année.

## CONTRIBUTIONS

Les filets ont été mis en place par Céline Lalanne, Olivier Bonnard, Eva Austruy, Julien Bonnier, Tanguy Menthonnex, Marie Rheinheimer, Grégoire Pauly, Rémy Petit, Clément Larue. Les fruits ont été récoltés par Rémy J. Petit, Clément Larue et Catherine Bedenès. Les analyses ont été réalisées par Rémy J. Petit, et le premier jet a été écrit par Clément Larue.

## RÉFÉRENCES

- Astray G, Fernández-González M, Rodríguez-Rajo FJ, et al (2016) Airborne *Castanea* pollen forecasting model for ecological and allergological implementation. Sci Total Environ 548–549:110–121.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.035>
- Bastl K, Bastl M, Dirr L, et al (2020) Frequency and distribution of insect pollinated pollen in air samples of Hirst-type volumetric pollen and spore traps in Austria from 2008 to 2017. Grana 59:58–70.  
<https://doi.org/10.1080/00173134.2019.1691254>
- Deguines N, Jono C, Baude M, et al (2014) Large-scale trade-off between agricultural intensification and crop pollination services. Front Ecol Evol 12:212–217. <https://doi.org/10.1890/130054>
- Garcia G, Re B, Orians C, Crone E (2021) By wind or wing: pollination syndromes and alternate bearing in horticultural systems. Phil Trans R Soc B 376:20200371. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0371>
- Larue C, Austruy E, Basset G, Petit RJ (2021a) Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea* spp.): an integrated approach. Bot Lett 168:348–372. <https://doi.org/10.1080/23818107.2021.1872041>
- Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021b) An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction. Ann For Sci 78:90. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01104-w>
- Pierre J, Vaissiere B, Vallée P, Renard M (2010) Efficiency of airborne pollen released by honeybee foraging on pollination in oilseed rape: a wind insect-assisted pollination. Apidologie 41:109–115.  
<https://doi.org/10.1051/apido/2009056>

# Evaluation du rôle des téléphores fauves mâles et femelles dans la pollinisation du châtaignier

## INTRODUCTION

La pollinisation du châtaignier correspondant au transport du pollen des étamines des chatons mâles d'un arbre vers les stigmates des fleurs femelles d'un autre arbre, il faut, pour montrer le rôle d'un insecte donné dans la pollinisation croisée du châtaignier, vérifier qu'il transporte du pollen de châtaignier sur son corps et qu'il le dépose sur les stigmates d'un autre arbre (Hasegawa et al. 2015). L'insecte le plus abondant lors de la floraison du châtaignier était le téléphore fauve (*Rhagonycha fulva*), un cantharidé (une famille de coléoptères floricoles ; Larue et al. 2021). Chez cet insecte, le dimorphisme sexuel est très marqué : les femelles sont plus lourdes que les mâles et le comportement des deux sexes sont contrastés : les mâles se déplacent plus que les femelles (Rodwell et al. 2018). On peut alors s'attendre à ce que l'efficacité de la pollinisation diffère entre les téléphores mâles et les téléphores femelles.

La capacité à produire du pollen varie fortement chez les châtaigniers : elle peut être très forte chez certains châtaigniers longistaminés, et au contraire être nulle chez les individus astaminés dont les étamines sont avortées. On s'attend donc à ce qu'un insecte prélevé sur un arbre staminé possède une quantité importante d'autopollen, tandis qu'un insecte prélevé sur un arbre astaminé ne sera recouvert que du pollen des arbres qu'il a visités précédemment.

Nous avons donc cherché à :

- (1) quantifier les charges en pollen de châtaignier des téléphores fauves, en fonction du type d'arbre sur lequel ils étaient présents ;
- (2) comparer les charges en pollen de châtaignier des téléphores fauves mâles et femelles ;
- (3) étudier l'origine du pollen présent sur les téléphores mâles et femelles.

Pour cela, nous avons utilisé des approches microscopiques d'identification morphologique et d'estimation du nombre de grains de pollen portés par les insectes et tenté d'utiliser des approches moléculaires pour caractériser génétiquement les grains de pollen et identifier les arbres qui les ont produits. L'objectif était de reconstituer le chemin parcouru par les insectes et de mieux comprendre leur comportement pour évaluer leur importance dans la pollinisation de l'arbre.

A partir d'ADN extrait de grains de pollen isolés, Hasegawa et al. (2015) ont étudié la composition du pollen présent sur le corps de différentes espèces d'insectes polliniseurs du châtaignier. Ils ont ensuite réalisé des analyses de paternité en utilisant un petit nombre de marqueurs microsatellites pour estimer le

nombre de donneurs de pollen efficaces représentés dans le pollen prélevé sur le corps de chaque insecte. Les approches moléculaires utilisées sont toutefois très laborieuses, impliquant un traitement séparé de chaque grain de pollen (extraction, PCR, génotypage). D'un autre côté, grâce à des approches de metabarcoding, la charge en pollen d'insectes pollinisateurs a commencé à être étudiée afin d'identifier les espèces de plantes donneuses de ce pollen (Bell et al. 2017 ; Pornon et al. 2019). Toutefois, à ce jour, le metabarcoding d'un mélange de pollen n'a pas été adapté pour identifier les différents individus qui ont donné le pollen, comme dans les travaux d'Hasegawa et al. (2015). Nous présentons ici une première tentative de caractérisation de la charge en pollen totale des téléphores faunes en utilisant des approches moléculaires novatrices (Lepais et al. 2020). Celle-ci n'a pas abouti mais a permis de préciser les étapes clés, ce qui sera utile pour poursuivre le projet.

## MATERIELS ET METHODES

### Echantillonnage

Nous avons sélectionné six arbres dans la collection de châtaignier INRAE (Larue et al. 2021) : deux copies clonales de trois variétés. A chaque fois, une copie clonale est choisie dans la parcelle A et l'autre dans la parcelle E. Ces trois variétés sont des hybrides *Castanea sativa* × *C. crenata* qui diffèrent par leur type de fleurs (elles sont ici présentées dans un ordre croissant de production de pollen) : ‘Bouche de Bétizac’ est astaminée, ‘Marlhac’ est mésostaminée, et ‘Maridonne’ est longistaminée.

Sur chacun de ces six arbres, nous avons récolté 100 insectes, soit 600 téléphores au total. Les insectes sont saisis à l'aide d'une pince souple lorsqu'ils sont sur l'arbre et placés individuellement dans des tubes Eppendorf d'1,5 mL possédant un identifiant unique. La pince était nettoyée à l'alcool après chaque capture d'insecte. Ces tubes sont ensuite conservés à -20 °C.

### Préparation des insectes

Pour l'estimation de la charge en pollen et l'extraction d'ADN, nous nous sommes inspirés de Pornon et al. (2019) et Baksay et al. (2020). Sous hotte aspirante, 300 µL de tampon de lyse CF (Macherey Nagel, Kit NucleoSPin Food) sont ajoutés à chaque tube contenant un insecte. Ces tubes sont ensuite placés dans un broyeur Geno Grinder (SPEX Sample Prep) et agités trois fois pendant deux minutes à 500 oscillations/min. Ce broyeur, lorsqu'il fonctionne à basse vitesse, comme ici, ne broie pas les insectes, mais permet de les laver grâce à ces oscillations verticales. Ainsi nous pouvons récupérer rapidement (moins de 10 min) le pollen présent sur le corps de 48 insectes. Après lavage, l'insecte est conservé pour le sexage et placé dans un second tube Eppendorf d'1,5 mL portant le même identifiant unique. De plus, 60 µL de la solution issue du lavage sont prélevés pour l'estimation de la charge pollinique de l'insecte et placés dans un troisième tube Eppendorf d'1,5 mL marqué avec le même identifiant unique. Enfin,

310 µL de tampon de lyse sont rajoutés au premier tube Eppendorf (ne contenant plus que 240 µL de solution de lavage) pour la suite de l'extraction d'ADN.

### Sexage et mesures morphométriques

Le sexage a été réalisé sous une loupe binoculaire Leica EM4 en utilisant comme critère la forme du pygidium (Rodwell et al. 2018 ; Magis 1963). Différentes mesures de taille ont été prises à l'aide d'un oculaire avec micromètre installé sur la même loupe binoculaire. La longueur de l'abdomen a été mesurée sur la totalité des insectes sexés. Pour apprécier plus en détail le dimorphisme sexuel, quatre mesures supplémentaires ont été réalisées sur 48 insectes (24 mâles et 24 femelles) : longueur du pronotum, largeur du pronotum, largeur des yeux, longueur des antennes, poids sec de l'insecte. Avec ces données, quatre rapports ont été calculé : charge alaire (poids sec / surface alaire totale, Gibb et al. (2006), longueur tête / longueur pronotum, longueur fémur / longueur pronotum, longueur tibia / longueur pronotum. Après déshydratation à l'étuve, les insectes sont pesés à l'aide d'une balance de précision.

### Charge en pollen

Lors de l'estimation de la charge en pollen, les grains de pollen de châtaignier ont été distingués du pollen provenant d'autres plantes que le châtaignier, sans chercher à identifier celles-ci. Les comptages ont été réalisés sur une cellule de Malassez sous un microscope optique (Baksay et al. 2020 ; Matsuki et al. 2008 ; Després 2003).

Nous faisons l'hypothèse que la quantité de pollen récupérée à chaque lavage successif suit une suite géométrique de raison  $q$  et de premier terme  $U_0$  ( $U_0$  correspond à la quantité de pollen récupérée lors du premier lavage, où  $U_{n+1}=q \cdot U_n$ ). Pour estimer  $q$ , une série de 12 insectes a été lavée deux fois successivement. Le rapport entre la quantité récupérée au premier lavage et la quantité récupérée au deuxième lavage nous sert alors d'estimateur de  $q$ . C'est cette estimation qui nous permet d'estimer la quantité de pollen total présent sur le corps de l'insecte ainsi que le pourcentage récupéré au premier lavage :

$$\text{Charge pollinique totale (CPT)} = \frac{U_0}{(1 - q)}$$

$$\text{Pourcentage récupéré au premier lavage (P}_1\text{)} = \frac{U}{CPT} \times 100 = (1 - q) \times 100$$

## Analyses statistiques

Les quelques insectes qui n'ont pas pu être sexés ne sont pas pris en compte dans les analyses. Les données morphométriques suivent une loi normale (test de Shapiro) et ont été comparées avec un test  $t$  de Student. Les charges polliniques sont des données de comptage et suivent une loi de Poisson. Elles ont été comparées à l'aide du test non paramétrique de Wilcoxon. Toutes les analyses ont été réalisées avec R (R Core Team, 2013).

## Extraction d'ADN

Nous avons sélectionné 72 insectes pour l'étude génétique de la charge en pollen, prélevés sur trois arbres de la parcelle A : 24 sur Bouche de Bétizac, 24 sur Marlzac et 24 sur Maridonne, avec à chaque fois 12 téléphones mâles et 12 téléphones femelles. Le protocole d'extraction utilisé est le kit NucleoFood Spin de Macherey-Nagel en suivant la méthode décrite dans Poron et al. (2016) et Baksay et al. (2020). L'ADN extrait est dosé à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop 8000.

## Microsatellites

Les marqueurs microsatellites présentés dans Laurent et al. (2020) ont été utilisés, ainsi que de nouveaux marqueurs microsatellites ultra-polymorphiques développés spécialement pour cette étude : ces marqueurs présentent un nombre plus élevé de motifs répétés (plusieurs dizaines contre une quinzaine seulement pour les marqueurs habituels), et parfois une juxtaposition de plusieurs motifs différents (jusqu'à trois types de répétitions). Comme nous caractérisons des mélanges de pollen et que les motifs SSR sont difficiles à interpréter après le séquençage à cause des erreurs de PCR (« stutter »), le génotypage par séquençage présenté dans Lepais et al. (2020) n'est peut-être pas la méthode la plus adaptée. Nous avons donc sélectionné une autre méthode : *Molecular Inversion Probe for Short Tandem Repeat* (MIPSTR ; Hiatt et al. 2013 ; Carlson et al. 2015 ; Tao et al. 2020). Cette méthode permet de s'affranchir du bruit de fond généré par les artefacts de PCR et de séquençage (Salk et al. 2018) car chaque sonde est « taguée » et il est ainsi possible d'identifier les erreurs de la Taq polymérase et de séquençage. La conception des sondes a été effectuée avec le progiciel Mipgen (O'rack et al. 2012), et chaque sonde MIP permet de capturer une zone de 250 nucléotides. Ces sondes sont composées de cinq parties : deux bras de ligation correspondant aux séquences flanquant le motif étudié, deux zones d'hybridation des amorce PCR, communes à toutes les sondes et permettant l'ajout des barcodes et adaptateurs nécessaires au séquençage, et pour finir un tag de huit nucléotides généré aléatoirement (UMI : Unique Molecular Index). Seules les sondes présentant un score donné par MIPgen supérieur à 0,7 ont été sélectionnées et toutes les sondes ont ensuite été validées individuellement via le logiciel IGV. L'objectif est de vérifier si le motif SSR voulu est bien présent et s'il y a une marge d'au moins 20 nucléotides avec les bras de

ligation. Au total, 100 sondes ont été sélectionnées : 80 pour les locus SSR décrits dans Laurent et al. (2020) et 20 pour les nouveaux marqueurs ultra-polymorphes.

## RESULTATS

### Sex-ratio

293 des 300 insectes étudiés ont pu être sexés : 201 mâles et 92 femelles ont été identifiés. Le sexe ratio de 2,2 est donc biaisé en faveur des mâles : le sexe ratio est significativement différent de l'unité ( $\chi^2$ ,  $p < 10^{-5}$ ).

### Mesures morphométriques

Sur l'échantillon de 293 insectes, les téléphores mâles pèsent en moyenne 7,0 mg contre 22,3 mg pour les femelles ; leur abdomen mesure 5,8 mm contre 7,4 mm pour les téléphores femelles. Les téléphores femelles ont donc en moyenne un abdomen 27 % plus long que celui des mâles et sont trois fois plus lourdes.

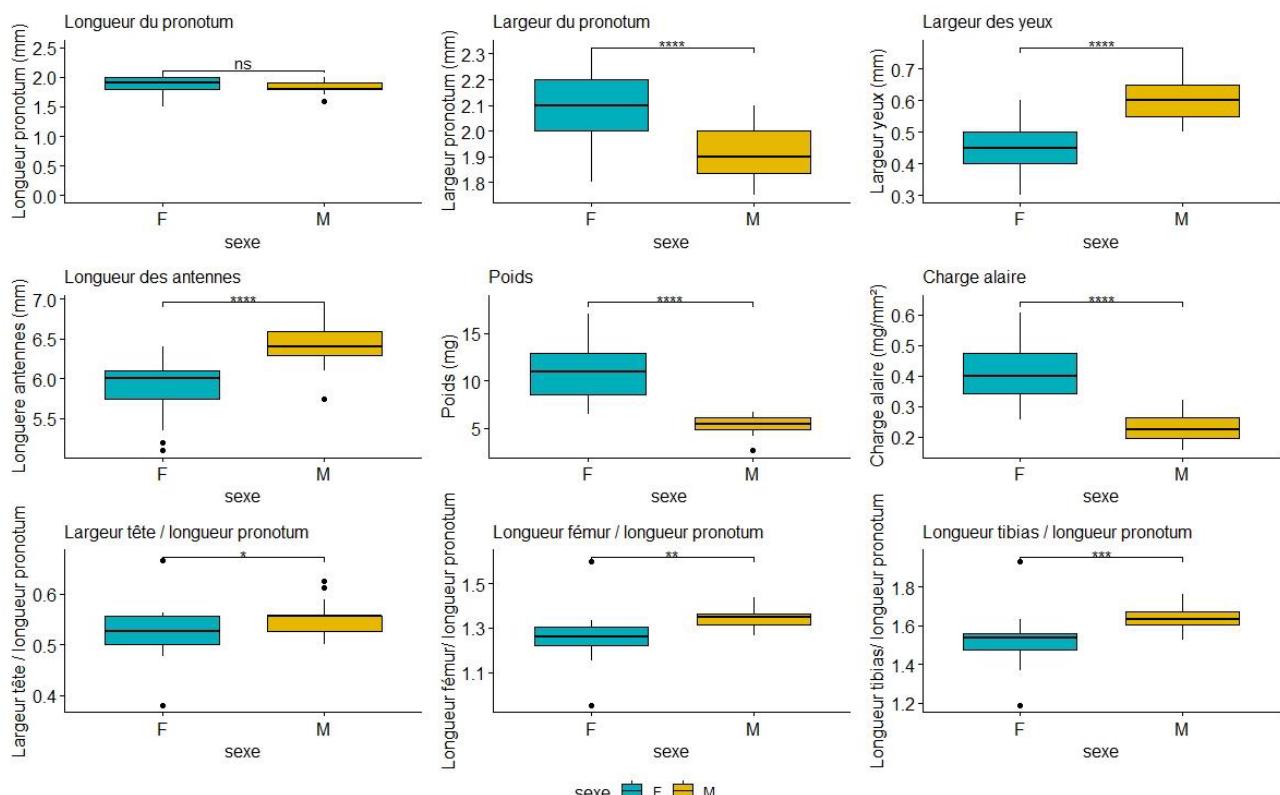


Figure 1 : Mesures morphologiques effectuées sur les 48 insectes, et ratio calculés

Sur la base de l'échantillon de 48 insectes étudiés plus précisément, nous trouvons que les téléphores femelles ont un pronotum plus large, sont plus lourdes et ont une charge alaire plus élevée que celle des mâles (Figure 1). De leur côté, les mâles ont des yeux plus larges, des antennes plus longues, une tête proportionnellement plus grosse et des pattes proportionnellement plus longues que celles des femelles.

## Charge en pollen

Dans notre cas,  $q = 0,35$  donc en moyenne 65 % du pollen est récupéré après ce premier lavage. Le nombre de grains de pollen de châtaignier compté sur un insecte est en moyenne de 43 275 tandis qu'il n'y a en moyenne que 252 grains de pollen appartenant à d'autres espèces de plantes, soit 0,6% de la charge totale en pollen transporté par l'insecte. Après correction, la charge en pollen de châtaignier est estimée à 67 565 grains de pollen par insectes (0 – 482 812) tandis que la charge en pollen d'autres espèces de plantes est de 394 grains de pollen par insecte.

Les charges moyennes en pollen des téléphores mâles prélevés sur 'Bouche de Bétizac' (astaminé), 'Marlhac' (mésostaminé) et 'Maridonne' (longistaminé) sont respectivement de 13 945, 49 096 et 170 902 grains de pollen, tandis que les charges moyennes en pollen des téléphores femelles échantillonnées sur ces mêmes arbres sont respectivement de 5 567, 29 741 et 100 537 grains de pollen.

*Tableau 1 : Charge moyenne en pollen des téléphores, en fonction du sexe, de la variété de l'arbre et la parcelle sur lequel ils ont été échantillonné.*

<u>Parcelle A</u>	Mâle	Femelle
'Bouche de Bétizac'	10300 (n = 32)	2106 (n = 17)
'Marlhac'	30009 (n = 34)	17336 (n = 14)
'Maridonne'	92691 (n = 34)	61569 (n = 13)

<u>Parcelle E</u>	Mâle	Femelle
'Bouche de Bétizac'	7990 (n = 29)	7030 (n = 21)
'Marlhac'	30291 (n = 34)	18550 (n = 15)
'Maridonne'	121926 (n = 38)	67350 (n = 12)

Dans chacune des deux parcelles (A et E), il y a une différence significative de charge en pollen suivant l'arbre sur lequel est échantillonné l'insecte (figure 2) : un téléphore collecté sur 'Maridonne' possède plus de pollen sur son corps qu'un téléphore collecté sur 'Marlhac' ( $p < 10^{-11}$ ), lui-même possédant plus de pollen qu'un téléphore collecté sur 'Bouche de Bétizac' ( $p < 10^{-9}$ ).

Pour ‘Bouche de Bétizac’, quelle que soit la parcelle étudiée, les téléphores mâles ont une charge en pollen significativement supérieure à la charge en pollen des téléphores femelles (parcelle A,  $p < 0.01$  : parcelle E,  $p < 0.05$ ). Pour ‘Marlhac’, dans la parcelle A, la charge en pollen est significativement plus élevée chez les mâles que chez les femelles ( $p < 0.05$ ). En parcelle E, la différence n'est pas significative. Pour ‘Maridonne’, il n'y a pas de différence de charge de pollen en fonction du sexe de l'insecte dans la parcelle A, mais celle-ci est légèrement significative dans la parcelle E,  $p < 0,05$ ).

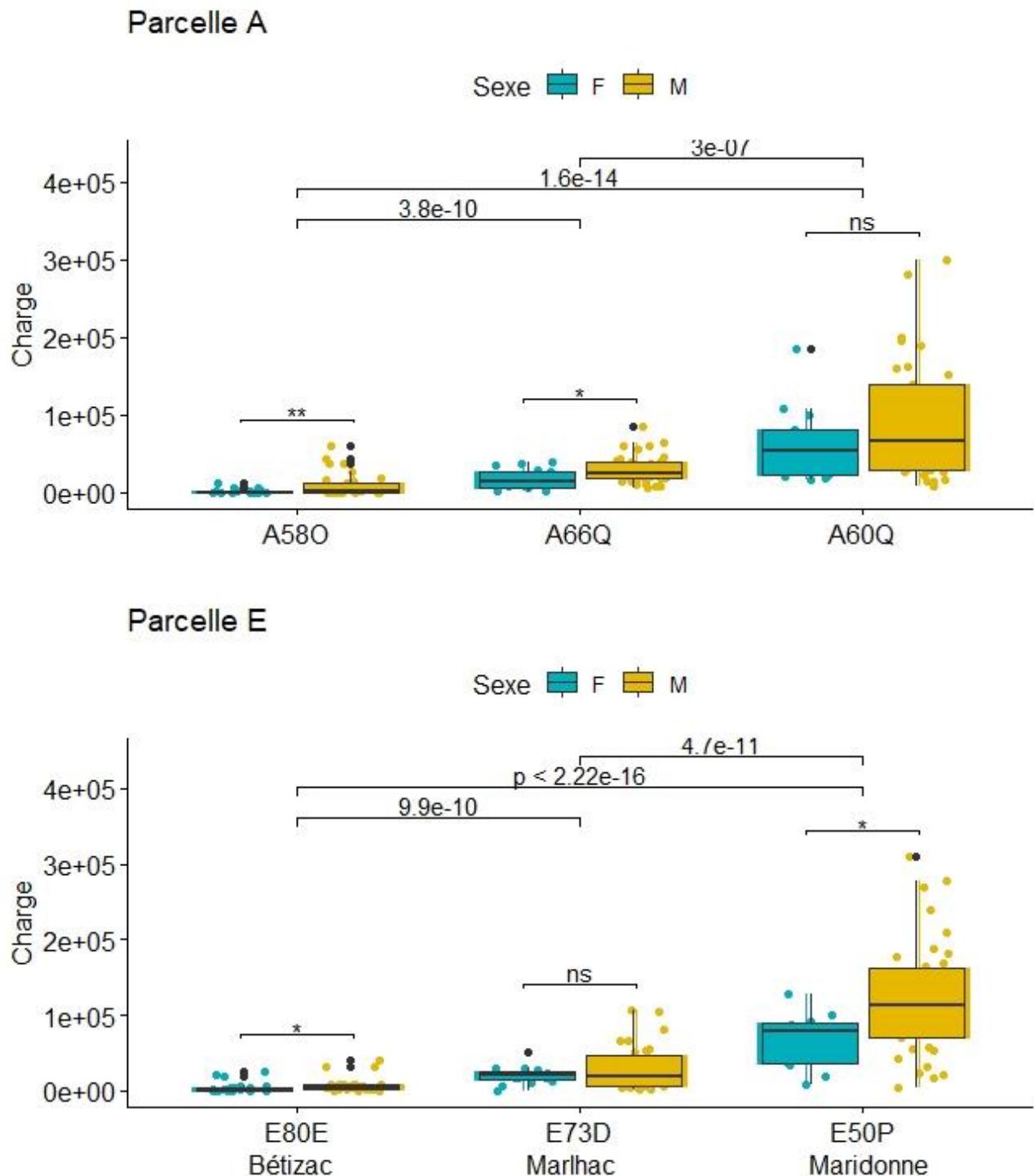


Figure 2 : Charge en pollen en fonction du sexe de l'insecte et de l'arbre sur lequel il a été prélevé.

## Génotypage par séquençage.

Nous n'avons pour l'instant pas de résultats à présenter dans cette partie, suite à différents problèmes rencontrés lors des premiers essais d'amplification de mélange de pollen. Les pistes pour résoudre ces problèmes sont abordées dans la discussion.

## DISCUSSION

Sur le site d'étude, le téléphore fauve transporte une grande quantité de pollen de châtaignier et peu de pollen autre que celui de châtaignier (résultats non présentés). Par rapport aux téléphores fauves mâles, les femelles sont plus lourdes, ont une charge alaire plus élevée, des fémurs et des tibias proportionnellement plus courts et une charge en pollen plus faible. Cela conforte l'hypothèse qu'elles ont une capacité de dispersion plus faible que celle des mâles (Rodwell et al. 2018). Nos données d'observation (résultats non détaillés ici) montrent que les interactions des téléphores fauves femelles avec les fleurs femelles sont effectivement nettement moins fréquentes que celles des mâles, confirmant leur faible rôle dans la pollinisation du châtaignier, d'autant que le sex-ratio est déséquilibré en faveur des mâles. A la différence des femelles, les téléphores mâles semblent avoir un comportement plus exploratoire lié à leur recherche active de partenaire sexuel dans des conditions où les femelles non encore accouplées sont rares. Il s'agirait donc d'un cas de dimorphisme sexuel comportemental des polliniseurs (Smith et al. 2019).

Plus l'arbre sur lequel sont échantillonnés les téléphores produit de pollen, plus les charges polliniques estimées sont élevées : par exemple, sur les insectes mâles récoltés sur les arbres longistaminés (mâle-fertiles), la charge en pollen est 12 fois plus élevée que pour ceux récoltés sur les arbres astaminés (mâle-stériles). On peut donc faire l'hypothèse que la charge en pollen des téléphores est essentiellement composée d'auto-pollen. Soit l'insecte perd une grosse quantité de pollen en volant d'arbre en arbre, et sa charge pollinique est alors essentiellement représentée par le pollen du dernier arbre sur lequel il s'est posé ; soit l'insecte se déplace peu, visite donc un très petit nombre d'arbres, et au moment de l'échantillonnage n'avait le plus souvent visité aucun autre châtaignier que celui sur lequel il se trouvait.

Les expériences de capture moléculaire n'ont pas fonctionné. Tout d'abord, nous n'avons pas trouvé de relation entre la quantité de pollen compté sur les insectes et la concentration de l'ADN extrait (résultats non présentés). Il est possible que le protocole ne soit pas adapté au pollen de châtaignier : il faudrait vérifier si le tampon de lyse est suffisamment agressif pour casser l'exine, la paroi particulièrement solide qui protège les grains de pollen, ou si un broyage mécanique serait plus adapté. Une autre possibilité serait que l'ADN du pollen de châtaignier ne représente qu'une petite part de l'ADN total extrait, qui serait alors composé majoritairement de l'ADN de l'insecte lui-même. Dans ce second cas, l'absence de relation

serait logique mais ne constituerait pas un réel problème puisque les marqueurs utilisés sont spécifiques du châtaignier, et qu'ainsi seul l'ADN du pollen sera amplifié.

Nous avons réussi à amplifier de l'ADN de pollen de châtaignier récupéré sur le corps d'insectes, en utilisant plusieurs paires d'amorces amplifiant des motifs microsatellites. Après migration sur gel, les amplicons obtenus à partir d'ADN d'arbres utilisés comme témoins positifs forment plusieurs bandes bien visibles, les extraits de pollen présents sur le corps des insectes aussi, même si ceux-ci sont moins bien amplifiés. Nous extrayons donc de l'ADN de châtaignier en faible concentration, amplifiable par PCR, ce qui nous encourage à poursuivre les développements techniques.

Enfin nous avons essayé plusieurs protocoles pour capturer les séquences grâce à la méthode MIPSTR mais les résultats ne sont pas encore concluants. La capture ne fonctionne pas correctement, et seulement quelques séquences sont utilisables, ne permettant pas de reconstruire les génotypes multilocus des échantillons étudiés. Il faut d'abord mettre au point cette nouvelle méthode avant de l'appliquer sur de l'ADN extrait à partir de pollen. Des tests pour maîtriser cette technique se poursuivent sur la Plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux.

De nouveaux tests et développements sont nécessaires pour pouvoir caractériser génétiquement la charge en pollen des téléphores. Cela fournirait une information précieuse, car comme le châtaignier est auto-incompatible, et que, d'après nos premiers résultats, il est possible que ce pollen soit majoritairement composée d'auto-pollen, la réelle qualité du service de pollinisation fournit par les téléphores pourrait être remise en cause.

## CONTRIBUTIONS

Ce travail s'appuie sur les résultats du stage de M2 de Sarah Gentet. L'échantillonnage des insectes a été réalisé par Clément Larue, et leur préparation a été réalisé par Sarah Gentet et Clément Larue. Le sexage et les mesures morphologies d'insectes ont été réalisés par Sarah Gentet, Bérangère Curtit et Grégoire Pauly. Les charges en pollen ont été mesurées par Sarah Gentet. Les extractions d'ADN ont été réalisées par Sarah Gentet et Clément Larue. Les analyses génétiques ont été réalisées avec le soutien du personnel de la PGTB par Sarah Gentet et Olivier Lepais. Les résultats ont été analysés par Sarah Gentet, Olivier Lepais, Rémy J. Petit et Clément Larue. Le premier jet de cet article a été écrit par Clément Larue.

## RÉFÉRENCES

Baksay S, Pernon A, Burrus M, et al (2020) Experimental quantification of pollen with DNA metabarcoding using ITS1 and trnL. Sci Rep 10:4202. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61198-6>

Bell KL, Fowler J, Burgess KS, et al (2017) Applying pollen DNA metabarcoding to the study of plant–pollinator interactions. Appl Plant Sci 5:1600124. <https://doi.org/10.3732/apps.1600124>

Carlson KD, Sudmant PH, Press MO, et al (2015) MIPSTR: a method for multiplex genotyping of germline and somatic STR variation across many individuals. *Genome Res* 25:750–761. <https://doi.org/10.1101/gr.182212.114>

Després L (2003) Sex and pollen: the role of males in stabilising a plant-seed eater pollinating mutualism. *Oecologia* 135:60–66. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1181-z>

Gibb H, Hjältén J, Ball JP, et al (2006) Wing loading and habitat selection in forest beetles: Are red-listed species poorer dispersers or more habitat-specific than common congeners? *Biol Conserv* 132:250–260. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.04.017>

Hasegawa Y, Suyama Y, Seiwa K (2015) Variation in pollen-donor composition among pollinators in an entomophilous tree species, *Castanea crenata*, revealed by single-pollen genotyping. *PLoS ONE* 10:e0120393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120393>

Hiatt JB, Pritchard CC, Salipante SJ, et al (2013) Single molecule molecular inversion probes for targeted, high-accuracy detection of low-frequency variation. *Genome Res* 23:843–854. <https://doi.org/10.1101/gr.147686.112>

Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021) An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction. *Ann For Sci* 78:90. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01104-w>

Laurent B, Larue C, Chancerel E, et al (2020) Microhaplotype genotyping-by-sequencing of 98 highly polymorphic markers in three chestnut tree species. *Conserv Genet Resour*. <https://doi.org/10.1007/s12686-020-01157-5>

Lepais O, Chancerel E, Boury C, et al (2020) Fast sequence-based microsatellite genotyping development workflow. *PeerJ* 8:e9085. <https://doi.org/10.7717/peerj.9085>

Magis N (1963) La structure abdominale des espèces du genre *Malthodes* Kiesenwetter (1982) : (Coleoptera, Cantharidae, Malthinini). *B Soc Roy Bot Belg* 32:

Matsuki Y, Tateno R, Shibata M, Isagi Y (2008) Pollination efficiencies of flower-visiting insects as determined by direct genetic analysis of pollen origin. *Am J Bot* 95:925–930. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800036>

O’Roak BJ, Vives L, Fu W, et al (2012) Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* 338:1619–1622. <https://doi.org/10.1126/science.1227764>

Pornon A, Baksay S, Escaravage N, et al (2019) Pollinator specialization increases with a decrease in a mass-flowering plant in networks inferred from DNA metabarcoding. *Ecol Evol* 9:13650–13662. <https://doi.org/10.1002/ece3.5531>

Pornon A, Escaravage N, Burrus M, et al (2016) Using metabarcoding to reveal and quantify plant-pollinator interactions. *Sci Rep* 6:27282. <https://doi.org/10.1038/srep27282>

R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche. <https://doi.org/URL https://www.R-project.org/>

Rodwell LE, Day JJ, Foster CW, Holloway GJ (2018) Daily survival and dispersal of adult *Rhagonycha fulva* (Coleoptera: Cantharidae) in a wooded agricultural landscape. *Eur J Entomol* 115:432–436. <https://doi.org/10.14411/eje.2018.043>

Salk JJ, Schmitt MW, Loeb LA (2018) Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations. *Nat Rev Genet* 19:269–285. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.117>

Smith GP, Bronstein JL, Papaj DR (2019) Sex differences in pollinator behavior: Patterns across species and consequences for the mutualism. *J Anim Ecol* 88:971–985. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12988>

Tao L, Raz O, Marx Z, et al (2020) Retrospective cell lineage reconstruction in humans using short tandem repeats. *Cell Reports Methods* 191296. <https://doi.org/10.1101/191296>

Echantillon	Lavage 1	Lavage 2
1	24687	6875
2	27500	9375
3	2187	1562
4	8125	3125
5	28125	17500
6	17812	10625
7	35000	10000
8	7187	8125
9	9375	15312
10	89375	13750
11	61875	13125
12	28750	11875
Moyenne	28333	10104

*Supplementary Figure 1: Charge en pollens des téléphones en fonction du sexe et de l'arbre sur lequel ils ont été prélevés.*



# Quels sont les principaux polliniseurs du châtaignier ?

## INTRODUCTION

Dans notre article publié dans *Botany Letters* (Larue et al. 2021a), nous mettons en évidence la grande diversité des insectes floricoles chez le châtaignier. Nous mettons aussi en évidence le rôle négligeable des abeilles domestiques dans sa pollinisation (car celles-ci ne visitent pratiquement pas les fleurs femelles) et la forte abondance de coléoptères, surtout du téléphore fauve qui représentait à lui seul 36 % des arthropodes identifiés et 64 % des interactions avec les fleurs femelles. Mais cette étude s'appuyait sur des relevés réalisés sur un seul site, les vergers de la collection INRAE de châtaignier, et une seule saison, le printemps 2019. De plus, nous n'avions pas recueilli beaucoup d'observations de visites aux fleurs femelles (66 en tout), faute d'un protocole adapté.

Cette étude de 2019 avait été réalisée dans un verger, dans des conditions a priori assez différentes de celles où ont co-évolué le châtaignier et ses polliniseurs. En effet, dans ce verger, on trouve des variétés sélectionnées, souvent très floribondes, plantées en lignes à espacement régulier. Il est donc légitime de se demander si les résultats trouvés en verger sont applicables à des forêts de châtaignier. Avant de généraliser ces résultats et de conclure à l'importance des coléoptères en général et des téléphores en particulier pour la pollinisation du châtaignier, il fallait reproduire ces observations. Nous avons donc engagé au printemps 2021 une seconde campagne de suivi des insectes floricoles dans les vergers de la collection INRAE mais aussi sur d'autres sites de la région Nouvelle-Aquitaine.

Nos objectifs étaient les suivants :

- (1) Déterminer quels insectes sont présents sur les châtaigniers en fleurs dans tous les sites étudiés, et notamment en forêt ;
- (2) Identifier les insectes qui visitent à la fois les fleurs mâles et les fleurs femelles ;
- (3) Vérifier que ces insectes visitent bien les fleurs femelles pendant leur période de réceptivité maximale.

## MATERIELS ET METHODES

### Sites d'études

Les relevés ont été réalisés sur quatre sites d'étude, grossièrement présentés par ordre croissant de fermeture du milieu (nous n'avons pas quantifié précisément ce paramètre). Le premier site est une haie mixte de châtaignier et de chêne plantée sur le domaine INRAE de Cestas-Pierrotin, entre une lande ouverte et une parcelle expérimentale d'Eucalyptus. Le second site est la parcelle A de la collection de

châtaignier INRAE (Larue et al. 2021c). Cette parcelle comprend 29 arbres de grande taille, plantés à faible densité, sur une surface de 2,3 ha. Le troisième site est l'autre parcelle du verger conservatoire, la parcelle E. Cette parcelle, sur laquelle la mortalité a été forte, suite à l'arrêt de l'irrigation et de la forte hétérogénéité du sol, est composée de 211 arbres plantés à plus forte densité sur une parcelle de 3,5 ha. Le dernier site d'étude est situé dans la vallée des Aldudes, dans le Pays Basque français. Plusieurs relevés y ont été réalisés dans des forêts anciennes mélangées comportant une proportion élevée de châtaignier, en milieu forestier fermé ou en bordure de forêt.

### Arbres étudiés

Pour les arbres de la collection INRAE, les mesures ont été effectuées du 1<sup>er</sup> juin au 8 juillet, deux fois par semaine entre 9 h et 16 h, ce qui fait un total de 12 relevés par arbre. Nous avons sélectionné huit arbres en parcelle E : deux copies clonales de quatre variétés différentes : Bouche de Bétizac (variété astaminée), Marlzac (mésostaminée), Ca120 (mésostaminée) et Maridonne (longistaminée). Sur la parcelle A, les inventaires ont été faits sur quatre arbres du 18 juin au 8 juillet. Les inventaires des châtaigniers de Cestas-Pierrotin ont été réalisés à deux reprises, les 23 et 26 juin. Les inventaires dans la vallée des Aldudes ont été réalisés du 28 au 30 juin et le 9 juillet pour les châtaigniers situés plus en altitude et particulièrement tardifs.

### Phénologie des arbres

Avant chaque relevé d'insectes, la phénologie de l'arbre est évaluée. Nous avons utilisé l'échelle BBCH que nous avons développée pour le châtaignier (Larue et al. 2021b). Chaque arbre a reçu trois notes : la première pour les chatons mâles unisexués, la seconde pour les fleurs femelles et la troisième pour les fleurs mâles des chatons bisexués.

### Relevés d'insectes

Le protocole utilisé s'inspire de celui utilisé par le programme de sciences participatives SPIPOLL (Suivi Photographiques des Insectes POLLiniseurs, Deguines et al. 2012). Pendant 10 min, l'arbre étudié est soigneusement inspecté par 2 à 3 personnes. Tous les insectes présents sur la canopée sont comptés à vue jusqu'à environ 2 m de haut. Au moins un individu est photographié pour chaque taxon rencontré à l'aide d'appareils photos numériques (Nikon D850, Nikon D7200 and Fujifilm X-T3) équipés d'un objectif macro (AF-S VR Micro-Nikkor 105 mm f/2.8 G and Fujinon XF 80 mm f/2.8 R LM OIS W Macro). Ces photos permettent d'identifier a posteriori ces insectes en utilisant des ressources disponibles en ligne comme la clé d'identification du SPIPOLL (<http://spipoll.snv.jussieu.fr/mkey/mkey-spipoll.html>) ou le site participatif "Le monde des Insectes" (<https://www.insecte.org/>).

## Interactions avec les fleurs femelles

Les interactions des insectes avec les fleurs femelles sont décrites dans des fiches comportant les rubriques suivantes : espèce d'insecte impliqué, sexe de l'insecte (si l'espèce peut être sexée à vue), stade phénologique de la fleur femelle, temps passé par l'insecte sur la fleur, déplacement de l'insecte avant et après avoir contacté la fleur. Ces observations sur les fleurs femelles sont effectuées à la fois de façon opportuniste lors des relevés d'insectes ou des relevés phénologiques, et durant des périodes d'observations de 10 min dédiées, permettant de se concentrer sur cette tâche.

## Taux de remplissage

Sur l'un des sites de la Vallée des Aldudes, dans la commune de Banca (64), nous avons effectué une mesure du succès de la pollinisation à l'automne 2021 : nous avons échantillonné au moins 30 bogues par arbre sur 15 arbres et compté les fruits pleins et vides. L'estimateur du succès de la pollinisation utilisé est présenté au chapitre 3, section 3.

## Analyses statistiques

Les analyses ont été réalisé avec R (R Core Team, 2013). Les proportions des principaux taxons sur les fleurs mâles et sur les fleurs femelles sont comparées à l'aide de test exact de Fisher.

# RESULTATS

## Relevés d'insectes

Durant le printemps 2021, 120 relevés d'insectes floricoles ont été réalisés sur châtaignier : le temps d'observation total est de 120 minutes (2 longs relevés d'une heure) sur le site de Cestas-Pierroton, de 380 minutes (19 relevés de 20 minutes) sur la parcelle A, de 1740 minutes (87 relevés de 20 minutes) sur la parcelle E de la collection INRAE, et de 220 minutes (11 relevés de 20 minutes) dans la vallée des Aldudes.

Nous avons compté 4486 insectes sur les châtaigniers et 315 sur les fleurs femelles (voir tableau 1). Ces insectes appartiennent à 99 taxons indépendants de rang spécifique ou supérieur, selon les groupes taxonomiques considérés, dont 48 % de diptères et 26 % de coléoptères (tableau 2).

Les diptères et les coléoptères, représentés par le plus grand nombre de taxons, sont aussi les insectes les plus abondants (voir tableau 1). Ils sont présents sur les quatre sites étudiés mais dans des proportions très variables. Les coléoptères représentent 79 % des insectes identifiés à Cestas-Pierroton, 66 % des insectes identifiés dans la parcelle A, 60 % des insectes identifiés dans la parcelle E, et 23 % des insectes identifiés dans la vallée des Aldudes. Les diptères représentent 8 % des insectes identifiés à Cestas-

Pierroton, 21 % des insectes identifiés dans la parcelle A, 29 % des insectes identifiés dans la parcelle E, et 75 % des insectes identifiés dans la vallée des Aldudes, où l'abondance des insectes visiteurs est la plus faible.

*Tableau 1 : Effectifs des différents taxons étudiés en fonction des sites.*

Sites	Cestas-Pierroton	Parcelle A	Parcelle E	Aldudes
Coléoptères	212	809	1616	19
Diptères	22	261	829	82
Hyménoptères	5	139	412	1
Lépidoptères	2	4	4	1
Hétérométaboles	27	7	27	7
Total (/relevé <sup>1</sup> )	268 (45)	1220 (64)	2888 (33)	110 (10)

<sup>1</sup>Entre parenthèses : nombre moyen d'insectes par relevé de 20 min

*Tableau 2 : Nombre de taxons identifiés sur châtaignier par grand groupe d'insectes*

Groupe	Coléoptères	Diptères	Hyménoptères	Lépidoptères	Autres
Nombre de taxons identifiés	26	48	10	4	11
%	26 %	48 %	10 %	2 %	11 %

Parmi les coléoptères, c'est le téléphore fauve qui domine : à lui seul, il représente 46 % des coléoptères identifiés à Cestas-Pierroton, 63 % des coléoptères identifiés de la parcelle A et 80 % des coléoptères identifiés dans la parcelle E. Nous ne l'avons pas vu dans les sites forestiers de la vallée des Aldudes, mais nous savons que l'espèce est présente dans la vallée car nous avons observé plusieurs individus sur un châtaignier champêtre, poussant en bord de prairie.

Les hyménoptères (abeilles et fourmis) sont peu abondants. Ils représentent 2 % des insectes identifiés à Cestas-Pierroton, 11 % des insectes identifiés dans la parcelle A, 14 % des insectes identifiés dans la parcelle E, et 1 % des insectes identifiés dans la vallée des Aldudes.

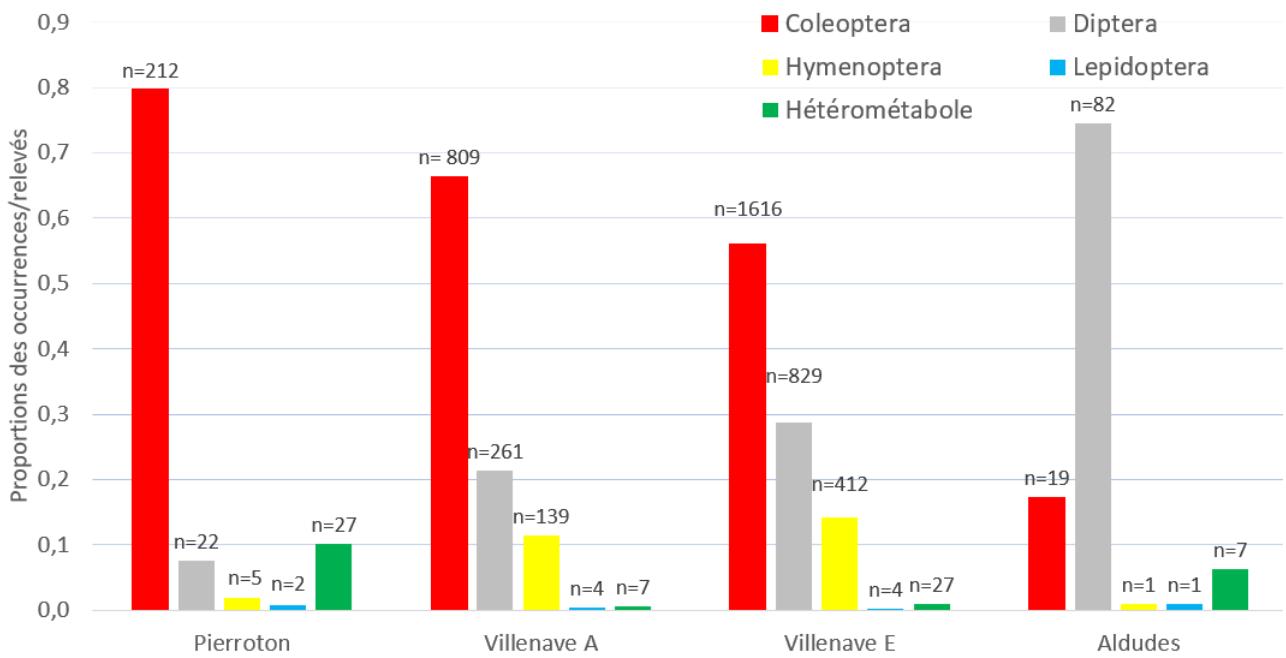


Figure 1 : Proportion et effectifs des insectes identifiés en fonction des sites d'études (classés par ordre croissant de fermeture du milieu).

### Interactions avec les fleurs femelles

En parcelle E, nous avons observé 214 interactions entre les insectes et les fleurs femelles (voir figure 2) : 155 avec des coléoptères, 47 avec des diptères, 11 avec des hyménoptères et 1 avec un hémiptère. Les coléoptères représentent donc 72 % des interactions insectes – fleurs femelles, dont 65 % des interactions pour le téléphore fauve à lui seul : c'est donc de loin le principal visiteur des fleurs femelles. Les diptères représentent 22 % des interactions avec les fleurs femelles, c'est le second groupe le plus important. Les hyménoptères ne représentent que 5 % des interactions avec les fleurs femelles, dont seulement 1 % pour les apidés.

En comparant les proportions observées sur arbres et sur fleurs femelles, on constate que les téléphones fauves sont surreprésentés sur les fleurs femelles (test exact de Fisher,  $p < 10^{-6}$ ) et les diptères et les hyménoptères sous-représentés (tests exacts de Fisher,  $p = 0,03$  pour les diptères,  $p < 10^{-5}$  pour les hyménoptères).

Le nombre de visite des arbres par les téléphones (figure 3a) augmente pendant les trois premières semaines (de 3 à 20 téléphones/relevé), atteint un plateau, puis diminue de la semaine 4 à la semaine 6 (de 22 à 6 téléphones/relevé). Les téléphones fauves ne visitent pas les fleurs femelles pendant la semaine 1, très peu pendant la semaine 2, puis le nombre de visites augmente fortement pendant les semaines 3 et 4 (42 téléphones/relevé puis 49 téléphones/relevé) avant de diminuer progressivement les semaines 5 et 6. Les visites des fleurs femelles par les téléphones sont donc maximales quand les châtaigniers ont le plus de chatons mâles unisexués émettant du pollen.

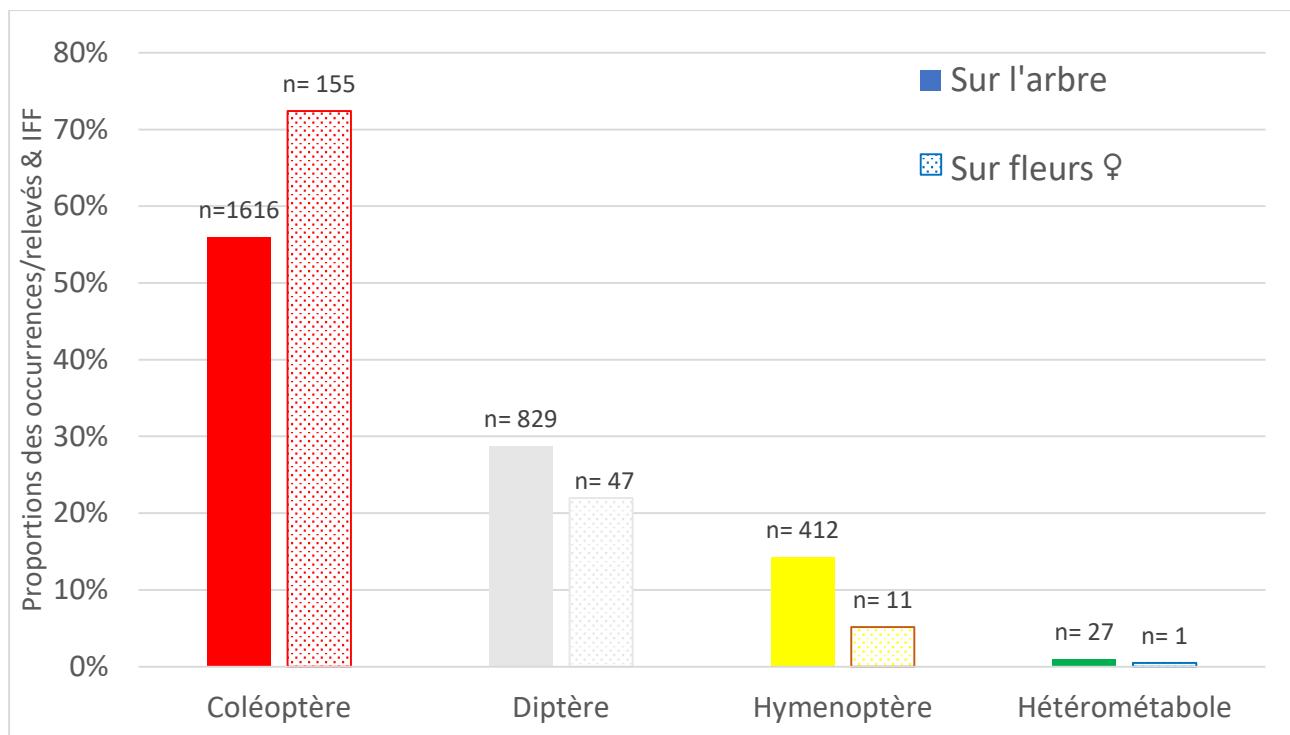


Figure 2 : Fréquences des principaux taxons d'insectes sur les arbres et sur les fleurs femelles des châtaigniers de la parcelle E.

Le nombre de visites des arbres par les diptères (figure 3, b) est stable au cours du temps (entre 8 et 10 diptères/relevé). Les diptères ne visitent pas les fleurs femelles pendant la première semaine, et très peu pendant les semaines 2 et 3. Puis le nombre des visites de fleurs femelles croît fortement pendant les semaines 4, 5 et 6 (passant de 10 interactions/relevé à 20 interactions/relevé). Donc le nombre d'interactions des diptères avec les fleurs femelles augmente à la fin de la floraison du châtaignier, quand les arbres émettent leur deuxième pic de pollen.

Dans la Vallée des Aldudes, en milieu forestier, où les insectes sont peu nombreux et représentés par une majorité de diptères, nous avons compté 852 fruits pour 1546 possibles sur 15 arbres, donnant un taux de pollinisation corrigé allant selon les arbres de 0,18 à 0,74 (moyenne de 0,53). Cette valeur est équivalente à celles trouvées en 2018 et 2019 dans la collection INRAE de châtaignier pour les arbres mâle-fertiles : 0,61 et 0,55, respectivement, voir chapitre 3. Plusieurs arbres ont des taux de remplissage très élevés ( $>2/3$ ) comparés à des arbres longistaminés présents dans les vergers, où les insectes, et notamment les coléoptères, sont beaucoup plus nombreux (chapitre 3).

## DISCUSSION

Nous confirmons que les hyménoptères ne sont guère impliqués dans la pollinisation du châtaignier, et ceci grâce à de nouvelles données plus conséquentes obtenues sur une autre année dans le même site

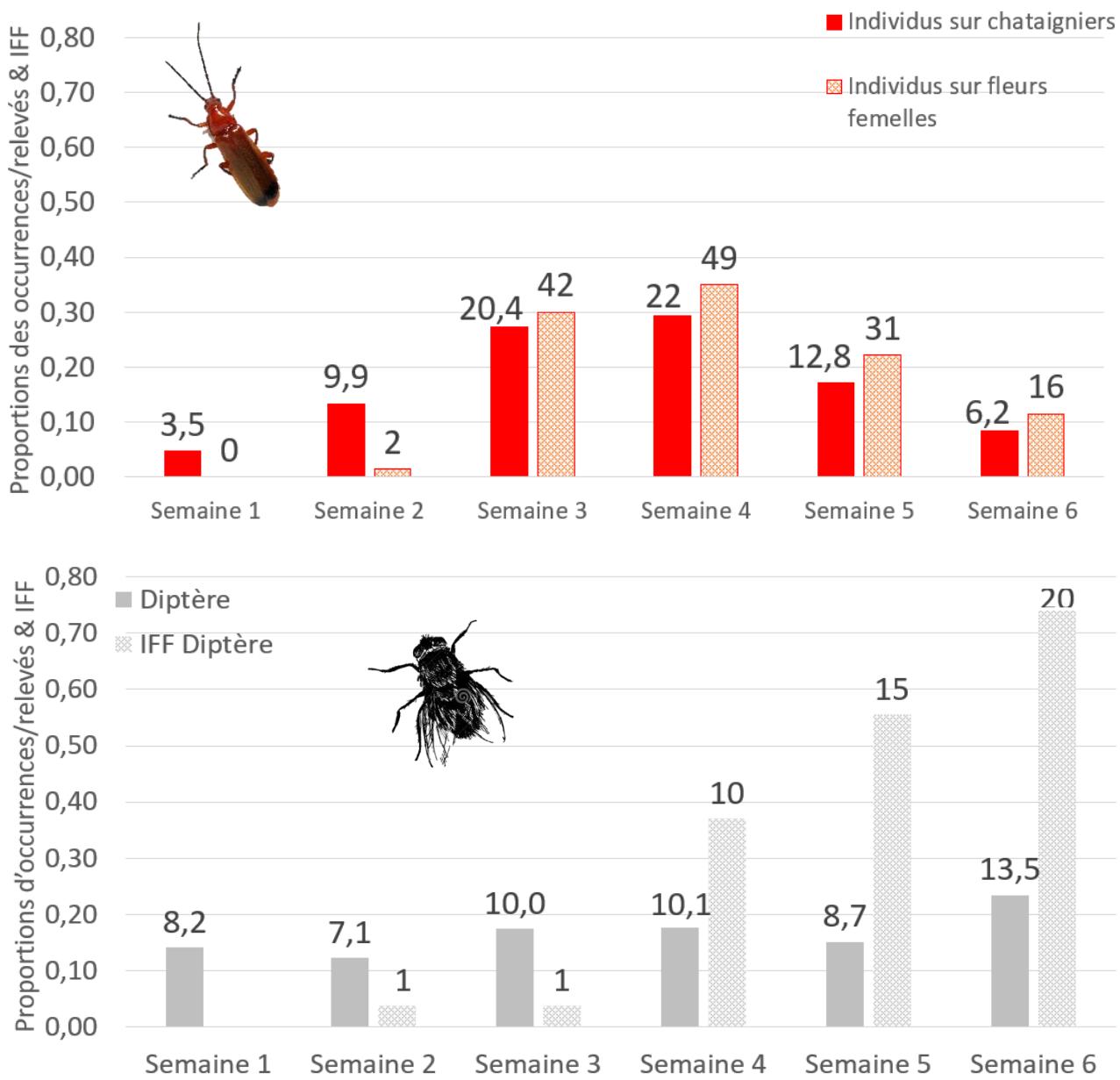


Figure 3 : Dynamique des téléphores fauves (en haut) et des diptères (en bas) durant la floraison du châtaignier. Evolution des abondance moyenne par relevés sur les fleurs mâles et les fleurs femelles en fonction des semaines d'observations.

d'étude et dans d'autres sites d'étude. Les coléoptères et les diptères sont les visiteurs des fleurs mâles et femelles du châtaignier les plus abondants, confirmant les résultats présentés dans Larue et al. (2021a).

Les téléphores fauves sont présents sur les quatre sites étudiés. Mais leur abondance varie fortement suivant le site étudié : ils sont quasi absents des sites les plus forestiers dans la Vallée des Aldudes. Notre hypothèse est qu'ils recherchent préférentiellement des milieux ouverts. Nos observations préliminaires montrent en effet que dans le verger conservatoire les arbres situés dans les parties les plus denses du verger, là où la canopée est plus fermée, reçoivent moins de visites d'insectes et notamment moins de visites des coléoptères. En Grande Bretagne, les téléphores sont présents en milieu forestier selon

Rodwell et al. (2018), mais après l'émergence, grâce à leur bonne capacité de dispersion, les insectes cherchent un endroit favorable plus ouvert pour se nourrir et se reproduire. Le succès de la pollinisation du châtaignier était plutôt élevé dans le seul site forestier où nous l'avons mesuré, un site où les insectes, essentiellement des diptères, sont peu nombreux au moment de la floraison.

Les parcelles A et E, où le téléphore domine, sont des parcelles très anthropisées et peu diversifiées : c'est une monoculture de châtaignier, fauchée régulièrement, entourée de vignes. Les châtaigniers de Cestas-Pierrotton sont bien moins impactés par ces facteurs, et la dominance du téléphore y est nettement réduite, au profit d'autres coléoptères. Cela pourrait signifier que le téléphore fauve est un insecte peu exigeant, favorisé par la pression anthropique (Fitton 1973).

Même si des différences existent dans le service de pollinisation des téléphores femelles et mâles, dans tous les cas ils restent longtemps sur le même arbre et se chargent en autopollen, comme démontré dans la partie précédente. Comme le châtaignier est largement auto-incompatible, l'autopollen ne peut que rarement féconder les fleurs femelles. En conséquence, même si les téléphores fauves sont très abondants pendant la pollinisation du châtaignier, l'efficacité de leur service de pollinisation pose question.

Les diptères pourraient être des pollinisateurs plus efficaces du châtaignier que les téléphores fauves, une hypothèse qui doit être confirmée. Leur plus grande abondance relative sur fleurs femelles en fin de la période de floraison est remarquable. En effet, à ce moment du cycle floral, le premier pic de floraison mâle est terminé : les insectes attirés par le pollen et le nectar des chatons mâles des rameaux bisexués (deuxième pic de production du pollen) se retrouvent ainsi à proximité immédiate des fleurs femelles. De plus, à ce moment de la floraison du châtaignier, la plus grande abondance relative des fleurs femelles comparé aux fleurs mâles pourrait augmenter les risques de confusion entre ces deux types de fleurs, dans l'hypothèse où le mécanisme d'auto-mimétisme des fleurs mâles par les fleurs femelles déterminerait une partie des visites aux fleurs femelles (Larue et al. 2021a). En outre, la position érigée des inflorescences femelles en ferait de bons « perchoirs à mouche » (Rémy Petit, communication personnelle). Enfin, les diptères observés sont très mobiles (déplacements aériens plus fréquents que pour les coléoptères en général) et viennent se percher précisément à l'extrémité des styles, où se trouvent les stigmates.

Evaluer la qualité du service de pollinisation du châtaignier par les différents insectes qui le visitent lors de la floraison nous semble important. Cela devrait permettre de mieux comprendre la coévolution entre cet arbre et ses insectes pollinisateurs à l'origine de la mise en place des traits floraux très originaux du châtaignier (duo-dichogamie, gynodioecie dans certaines populations, forte autointerférence), discutés dans les chapitres 3 et 4.

## CONTRIBUTIONS

Ce travail s'appuie sur les résultats du stage de M1 de Grégoire Pauly. Les suivis d'insectes ont été réalisés par Grégoire Pauly, Marie Rheinheimer, Céline Lalanne, Alice Bedani, Inge Van Halder, Olivier Bonnard, Bérangère Curtit et Clément Larue. Le repérage, la caractérisation des châtaigniers et la mesure du taux de remplissage a été réalisés par Rémy J. Petit, Catherine Bodenès, Bérangère Curtit, Alexis Ducousoo, Clément Larue, Jarvier Fernández-Cruz, Grégoire Pauly, Marie Rheinheimer. Les identifications d'insectes ont été réalisées par Grégoire Pauly. Les résultats ont été analysés par Grégoire Pauly, Rémy J. Petit et Clément Larue. Le premier jet de cet article a été écrit par Clément Larue.

## REFERENCES

- Deguines N, Jono C, Baude M, et al (2014) Large-scale trade-off between agricultural intensification and crop pollination services. *Front Ecol Evol* 12:212–217. <https://doi.org/10.1890/130054>
- Fitton MG (1973) Studies on the biology and ecology of Cantharidae (Coleoptera). Ph.D., University of London
- Larue C, Austruy E, Basset G, Petit RJ (2021a) Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea* spp.): an integrated approach. *Bot Lett* 168:348–372. <https://doi.org/10.1080/23818107.2021.1872041>
- Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021b) Efficient monitoring of phenology in chestnuts. *Sci Hortic* 281:109958. <https://doi.org/10.1016/j.scientia.2021.109958>
- Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021c) An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction. *Ann For Sci* 78:90. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01104-w>
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche. <https://doi.org/URL https://www.R-project.org/>
- Rodwell LE, Day JJ, Foster CW, Holloway GJ (2018) Daily survival and dispersal of adult *Rhagonycha fulva* (Coleoptera: Cantharidae) in a wooded agricultural landscape. *Eur J Entomol* 115:432–436. <https://doi.org/10.14411/eje.2018.043>



# Chapitre 3

---

Stérilité mâle et succès de la pollinisation







## Préambule

La floraison du châtaignier est particulièrement complexe (Larue et al. 2021) : cet arbre est monoïque, c'est-à-dire que ses fleurs mâles et femelles sont séparées sur un même individu. Les fleurs sont rassemblées sur des inflorescences appelés chatons, qui sont de deux types : des chatons unisexués mâles et des chatons bisexués composés d'une ou deux inflorescences femelles portant trois fleurs, puis à l'extrémité d'une courte inflorescence mâle ressemblant aux chatons unisexués. A l'échelle des inflorescences, le châtaignier est donc andromonoïque. Au sein des chatons bisexués, les fleurs mâles et femelles sont séparées dans l'espace, c'est l'herkogamie, et leurs périodes de floraison (émission de pollen, réceptivité du pollen) sont en partie distinctes, c'est la dichogamie. Le châtaignier est en fait duodichogame à l'échelle de l'arbre entier, c'est-à-dire que le plus souvent les fleurs mâles des chatons unisexués émettent du pollen, puis les fleurs femelles deviennent réceptives, et enfin les fleurs mâles des chatons bisexués émettent à leur tour du pollen. Enfin, il existe deux sexes différents : des individus mâle-stérile reconnus grâce à leurs étamines plus courtes et des anthères souvent avortées, et des individus bisexués, aux étamines plus longues et aux anthères bien développées.

L'existence de châtaigniers mâle-stériles a depuis longtemps été remarquée par les agriculteurs. Les chercheurs ont ensuite classé les châtaigniers en différentes catégories suivant l'aspect de leurs étamines. Chez les arbres complètement mâle-stériles, aucune des fleurs ne produit de pollen, et cela tout au long de leur vie. Mais chez beaucoup d'autres arbres, un certain degré de fertilité mâle est maintenu : il existe en fait tout un gradient d'arbres plus ou moins mâle-stériles. L'origine de cette stérilité mâle n'a pas été étudiée. Parmi les hypothèses formulées, l'un d'elle serait que cette stérilité mâle serait la conséquence de la sélection anthropogénique (Josefa Fernández-López, Teresa Barreneche, communications personnelles) : en sélectionnant des arbres produisant beaucoup de fruits, des variétés investissant moins dans les fonctions mâles auraient été indirectement sélectionnées. Mais à ce jour, aucune publication n'existe sur la question de l'origine de cette stérilité mâle.

Si certains arbres sont naturellement mâle-stériles, c'est-à-dire fonctionnellement femelles, on serait dans le cas d'une espèce gynodioïque, c'est-à-dire dont les populations sont composées d'individus femelles et d'individus hermaphrodites dans des proportions qui peuvent être variables. Ces individus femelles doivent donc avoir un avantage pour se maintenir. Mais quel serait cet avantage ?

Le taux de remplissage des bogues est le nombre de fruits développés contenus dans les bogues, sur un total de trois fruits possibles. Le postulat est que meilleure est la pollinisation, plus le taux de remplissage sera élevé. Cette mesure a notamment été intensivement utilisée dans le programme de sélection du châtaignier pour les tests de pollinisation contrôlée effectués à la fin des années 80 par l'INRA et à la fin

des années 90 par le Centre Inter-Régional d'Expérimentation Arboricole (CIREA) (Invenio 2021). Différentes variétés donneuses de pollen ont été testées individuellement sur une variété cible, et le nombre de fruits que celle-ci produisait été compté. La variété pollinisatrice qui engendrait le plus grand nombre de fruits était considérée comme étant la meilleure (Breisch 1995). Ce taux de remplissage est aussi utilisé pour estimer la qualité du service de pollinisation dans les vergers de production (Invenio 2021) : les taux de remplissage de plusieurs variétés cibles plantées dans différents vergers sont comparés. Les taux de remplissage d'un des vergers étudiés sont comparés aux taux de remplissage moyens. Les vergers avec les meilleurs taux de remplissages sont considérés comme étant les mieux pollinisés. Mais cette mesure du taux de remplissage dépend-elle seulement de la pollinisation ? Ou dépend-elle aussi d'autres facteurs ? Cela n'a pas été étudié jusqu'à présent.

Ce chapitre commence par une première partie intitulée « **Mise en évidence d'une stérilité mâle cytoplasmique chez le châtaignier européen** » dans laquelle je m'intéresse à l'origine de la stérilité mâle du châtaignier, et montre qu'il s'agit probablement d'une stérilité mâle cytoplasmique d'origine naturelle : le châtaignier européen serait donc une espèce gynodioïque. Ensuite, dans une deuxième partie intitulée « **Comment mesurer le succès de la pollinisation du châtaignier ?** » je m'interroge sur la manière la plus efficace d'estimer le succès de la pollinisation. Je montre que pour estimer le succès de la pollinisation, le taux de remplissage est préférable au taux de production de bogues, mais j'explique qu'une correction des données par un modèle adapté est nécessaire. Enfin, je montre dans un court texte intitulé « **Le taux de remplissage des bogues dépend-il des ressources ?** » que le taux de remplissage ne dépend probablement pas des ressources dont disposent les arbre-mères. J'étudie pour cela la relation entre le taux de remplissage des bogues et le poids des fruits qu'elles contiennent. Pour finir, je clôture ce chapitre par un projet d'article intitulé « **Self-interference and female advantage in chestnut** » dans lequel nous démontrons que les arbres mâle-stériles ont un bien meilleur taux de remplissage que les arbres mâle-fertiles et que ce fort avantage à être femelle n'est sans doute pas lié à une réallocation des ressources de la fonction mâle vers la fonction femelle, ni à une meilleure allogamie permettant d'éviter la consanguinité, mais essentiellement à l'absence d'autointerférence entre les fonctions mâles et femelles chez ces arbres ne produisant pas ou peu de pollen.

## REFERENCES

- Breisch H (1995) Châtaignes et Marrons. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, Paris, France  
Invenio (2021) Tests de pollinisations contrôlées. Douville  
Larue C, Austruy E, Basset G, Petit RJ (2021) Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea* spp.): an integrated approach. Bot Lett 168:348–372. <https://doi.org/10.1080/23818107.2021.1872041>

# Mise en évidence d'une stérilité mâle cytoplasmique chez le châtaignier européen

## INTRODUCTION

La stérilité mâle cytoplasmique, « *cytoplasmic male sterility (CMS)* » en anglais, est un phénotype associé à des plantes qui ne produisent plus de pollen fonctionnel. Cette stérilité mâle a été observée chez plus de 150 espèces de plantes (Schnable et Wise 1998). Le phénotype résulte de l'interaction entre le génome mitochondrial, qui détermine la stérilité mâle, et le génome nucléaire. Ce dernier, grâce à l'expression de gènes restaurateurs de la fertilité, peut limiter voire même supprimer cette stérilité mâle (Chase 2007). La plupart du temps, les plantes possédant une CMS sont identiques aux plantes normales n'en possédant pas, sauf pour la stérilité mâle (Chase 2007). En effet, si la plante possède un système de restauration de la fertilité efficace, il n'est pas possible de faire la différence entre une plante possédant une CMS et une plante n'en possédant pas (Schnable et Wise 1998). Comme le génome mitochondrial est transmis maternellement chez la plupart des espèces de plantes (Hagemann 2004), cette CMS est le plus souvent transmise par la mère via la graine.

Par définition, chez les espèces gynodioïques, des individus hermaphrodites et femelles coexistent dans les mêmes populations. Les individus femelles produisent généralement plus de graines que les individus hermaphrodites : c'est l'avantage à être femelle (*female advantage*) (Dufay et Billard 2012). Dans les populations naturelles, les modèles de génétique des populations indiquent que la stérilité mâle cytoplasmique peut conduire à la gynodioécie bien plus facilement que quand la stérilité mâle est déterminée uniquement par le génome nucléaire (Lewis 1941 ; Gouyon et Couvet 1985 ; Budar et al. 2003 ; Charlesworth 2002 ; Dufay et al. 2012).

Les premiers cas de stérilité mâle chez le châtaignier ont été découverts au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle (Kaul 1988). La plupart des étamines des individus appelés astaminés avortent et ne produisent donc pas de pollen (figure 1, A). Ces arbres astaminés se distinguent des individus staminés (Breisch 1995). Parmi ceux-ci, il y a en fait toute une gradation suivant la longueur du filet des étamines dont semble dépendre la capacité à produire du pollen (figure 1, B, C, et D) : les arbres brachystaminés (filets des étamines de 3 à 5 mm de long) et ceux mésostaminés (filets de 3 à 5 mm de long) seraient largement mâle-stériles et seuls les arbres longistaminés (filets de 5 à 7mm de long) seraient de bons donneurs de pollen (Breisch 1995). L'origine cytoplasmique de cette stérilité mâle a été suggérée dans le cas de croisements contrôlés interspécifiques impliquant des châtaigniers chinois *Castanea mollissima* et des châtaigniers américains *C. dentata*. Lorsque la mère est un *C. dentata*, la plupart des descendants sont stériles, tandis que quand la

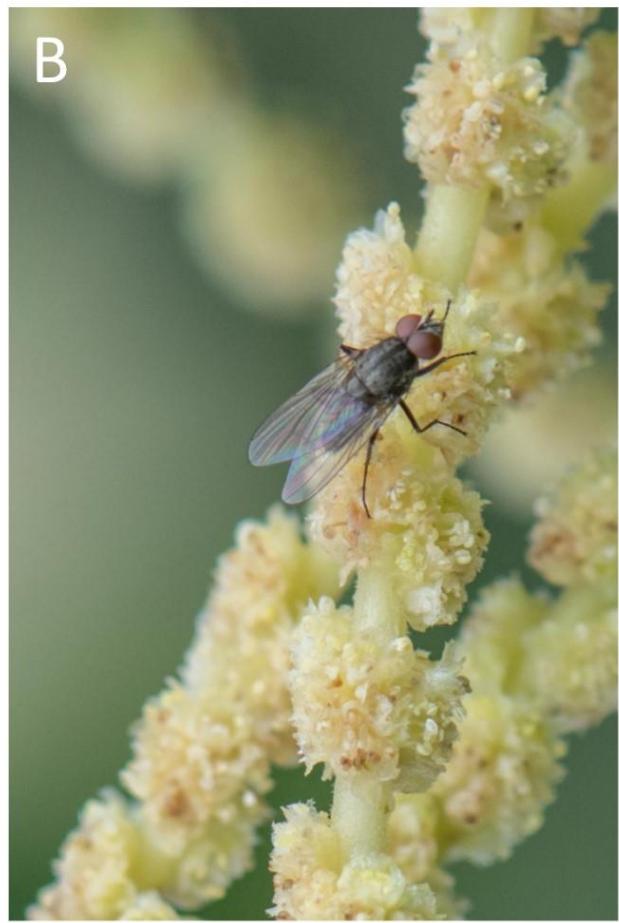


Figure 1 : Les différents types de fleurs mâles du châtaignier. Les étamines des fleurs astaminées (A) sont au fond des glomérules et ont avorté dans la grande majorité des cas. Les fleurs brachystaminées (B) possèdent peu d'étamines et celles-ci ne dépassent pas des glomérules. Les étamines des fleurs mésostaminées (C) dépassent légèrement des glomérules. Enfin, les fleurs longistaminées (D) possèdent des étamines avec de longs filaments.

mère est un *C. mollissima*, la plupart des descendants sont fertiles (Shi et Hebard 1997 ; Sisco et al. 2014). Même si nous n'avons trouvé aucun article prouvant la transmission maternelle du génome chloroplastique ou mitochondrial chez le châtaignier, cette hypothèse semble fort probable. En effet, les génomes chloroplastiques et mitochondriaux d'espèces proches, comme le chêne (Dumolin et al. 1995), sont transmis maternellement. L'analyse du polymorphisme du génome chloroplastique du châtaignier européen *C. sativa* dans tout le bassin Méditerranéen a révélé une faible diversité (Fineschi et al. 2000). Il n'existe par contre pas de travail sur le lien entre haplotypes cytoplasmiques et stérilité mâle impliquant le châtaignier européen.

Grâce aux nouvelles techniques de génotypage par séquençages de microsatellites (*Single Sequence Repeat*) (Lepais et al. 2020), il est devenu possible de développer de nombreux marqueurs SSR pour des espèces encore peu étudiées, notamment lorsque le génome de celles-ci a été séquencé. Depuis peu, des génomes chloroplastiques complets de référence sont disponibles pour plusieurs espèces de châtaignier : le châtaignier de Virginie (*C. pumila* ; Dane, 2015), le châtaignier de Seguin (*C. seguinii* ; Zulqifar et al. 2019 ; Cheng et al. 2019), le châtaignier chinois (*C. mollissima* ; Zhu et al. 2019), le châtaignier japonais (*C. crenata* ; Kang et al. 2019), et le châtaignier européen (*C. sativa* ; Xu et al. 2021).

Nous avons donc choisi de développer de nouveaux marqueurs chloroplastiques pour caractériser la collection INRAE de châtaigniers de Villenave d'Ornon, afin d'étudier le lien entre lignée maternelle et stérilité mâle. Nous voulons répondre aux questions suivantes : La diversité génétique de l'ADN chloroplastique du châtaignier est-elle réduite ? Quel est le mode de transmission de la stérilité mâle ? Cette stérilité est-elle associée à des haplotypes cytoplasmiques particuliers ?

## MATERIELS ET METHODES

### Site d'étude

Les arbres étudiés sont issus de la collection INRAE de châtaignier INRAE (Larue et al. 2021a). Ces arbres ont été caractérisés à l'aide de marqueurs nucléaires : 79 SNP (Larue et al. 2021b) et 98 SSR (Laurent et al. 2020). En tout, 94 génotypes uniques ont été identifiés. Ces génotypes uniques sont affectés aux différentes espèces et catégories d'hybrides grâce des analyses dédiées (logiciel STRUCTURE, voir Larue et al. 2021b). Pour la présente étude, un individu de chaque génotype a été caractérisé à l'aide de marqueurs chloroplastiques.

### Extraction d'ADN

De jeunes feuilles ont été récoltées sur les arbres de la collection au début du printemps. Ces feuilles sont stockées à 4 °C et sont rapidement mises en plaques. Pour chaque individu, 50 mg de feuilles sont

découpées finement avant d'être placées dans une plaque composée de 12 barrettes de 8 tubes d'1,2 mL. Ces échantillons sont lyophilisés pendant une nuit, la veille de l'extraction. Le protocole utilisé pour l'extraction d'ADN est présenté dans Larue et al. (2021b). Comme les feuilles sont sèches, il n'est pas nécessaire d'utiliser de l'azote liquide pour les broyer à froid. Un tampon de lyse à 1,4 M de NaCl a été utilisé pour extraire l'ADN. Tous les ADN extraits sont dosés avec un spectrophotomètre Nanodrop 8000 et tous les échantillons sont dilués à 15 ng/ $\mu$ L.

### Marqueurs SSR chloroplastiques

La sélection et le génotypage des SSR chloroplastiques ont été réalisés selon le protocole décrit dans Lepais et al. (2020). Les 32 sites d'amplification ciblant des marqueurs SSR ont été choisis en utilisant les différents génomes chloroplastiques complets comme références. Les amorces sélectionnées ne possèdent aucun homopolymère, ni nanosatellites dans leurs zones de fixation, et l'amplicon mesure entre 120 et 250 pb. Des tags Illumina spécifiques sont ajoutés aux extrémités 5' des amorces *forward* : 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-3' et des amorces *reverse* 5'-GTC TCG TGGGCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACAG-3'; ces différents marqueurs SSR sont testés séparément en amplifiant l'ADN de quelques échantillons par PCR Simplex. Au total, 32 régions de l'ADN chloroplastique sont amplifiées correctement et utilisées pour génotyper les 94 génotypes uniques de la collection de châtaignier. Une seconde PCR est réalisée pour ajouter les adaptateurs Illumina et les barcodes, à l'issu de laquelle ces amplicons sont purifiés (*Solid Phase Reversible Immobilisation beads*), quantifiés (LC480 II qPCR avec le kit KAPA Library Quantification), mesurés (TapeStation 4200) et séquencés avec un séquenceur Illumina iSeq100 (2 × 250 bp). Après démultiplexage et contigage des paires de séquences, le génotypage est effectué avec FDSTOOLS suivant la méthode présentée dans Lepais et al. (2020). Seuls les locus avec moins de 5 % d'erreurs de génotypage et moins de 30 % de données manquantes sont conservés pour la suite des analyses.

### Caractérisation du polymorphisme sexuel au sein de populations naturelles de châtaignier

Nous avons caractérisé le polymorphisme sexuel dans deux forêts mixtes de châtaignier d'origine présumée naturelle. La première se situe dans le parc naturel Fragas do Eume (figure 2), en Galice au Nord-Ouest de l'Espagne. Sur ce site, on trouve une des dernières forêts atlantiques d'Europe en bon état de conservation. Dans cette forêt de moyenne montagne située proche de la côte, les châtaigniers sont d'origine locale selon des analyses génétiques récentes (Fernández-López et al. 2021). Nous avons visité cette forêt le 17 juillet 2019 et caractérisé *in situ* le polymorphisme sexuel des châtaigniers. Les observations du type de fleurs ont été faits avec des jumelles, et les fleurs ont été photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique (Fujifilm XT-3) équipé d'un téléobjectif (Fujifilm Fujinon XF 100-400

mm f/4,5-5,6 R LM OIS WR). Pour classer les arbres, nous nous sommes appuyés sur la classification INRAE (Breisch 1995). Les arbres astaminés, brachystaminés et mésostaminés sont classés comme mâle-stériles tandis que les arbres longistaminés sont classés comme mâle-fertiles. Une fois les arbres décrits, le pourcentage de châtaignier mâle-stérile (ceux des trois premières catégories) est ensuite calculé.

La deuxième population se trouve dans la forêt syndicale de Baigorry, commune de Banca, au sein de la vallée des Aldudes, dans le Pays Basque français. Des analyses génétiques sont en cours, mais les éléments suivants nous incitent à privilégier une origine naturelle : dans cette vallée : les châtaigniers sont



Figure 2 : Forêt océanique atlantique de Fragas do Eume. Cette forêt mixte située sur une forte pente est composée de nombreuses espèces caducifoliées. Des châtaigniers en fleurs sont visibles sur cette photo, où on voit également un début d'invasion par des eucalyptus.

abondants, ils forment des futaies mixtes avec le chêne pédonculé et diverses autres espèces de feuillus, sur pentes parfois fortes. De plus, ces peuplements sont constitués de forêts anciennes selon la cartographie récemment complétée par l'IGN. Enfin, un refuge glaciaire a été mis en évidence à proximité à l'aide de restes fossiles (Krebs et al. 2019). Nous avons visité cette forêt les 30 juin et 9 juillet 2021 et caractérisé la floraison des châtaigniers de la même manière que pour la population espagnole.

## RESULTATS

Tous les locus sélectionnés sont amplifiés correctement et présentent suffisamment peu d'erreurs de génotypages. Sur ces 32 locus séquencés, 31 sont polymorphiques. En moyenne, il y a 4,3 allèles par locus (2-6) et le pourcentage de données manquantes (% NA) est inférieur à 1 % (0,96 % ; 0 %-11,7 % ; Tableau 1).

Tableau 1 : Nombre d'allèles et fréquences alléliques à chaque locus cpSSR

Locus	N ind	% NA	# allèles	101	102	103	104	105	106	107
cS_4	94	0,00	4	0,596	0,181	0,202	0,021			
cS_8	94	0,00	4	0,021	0,574	0,202	0,202			
cS_15	94	0,00	5	0,021	0,574	0,181	0,021	0,202		
cS_17	94	0,00	2	0,979	0,021					
cS_18	94	0,00	5	0,021	0,021	0,181	0,574	0,202		
cS_20	94	0,00	4	0,574	0,223	0,021	0,181			
cS_21a	94	0,00	4	0,181	0,021	0,202	0,596			
cS_21b	94	0,00	3	0,798	0,181	0,021				
cS_25	92	2,13	5	0,185	0,022	0,587	0,022	0,185		
cS_27	94	0,00	4	0,021	0,755	0,021	0,202			
cS_28a	93	1,06	5	0,022	0,183	0,204	0,022	0,570		
cS_28b	94	0,00	5	0,202	0,021	0,181	0,021	0,574		
cS_28c	93	1,06	5	0,022	0,183	0,570	0,204	0,022		
cS_33a	94	0,00	5	0,574	0,021	0,021	0,181	0,202		
cS_33b	94	0,00	5	0,021	0,021	0,202	0,574	0,181		
cS_36	94	0,00	4	0,574	0,202	0,202	0,021			
cS_38a	93	1,06	2	0,978	0,022					
cS_38b	93	1,06	5	0,204	0,570	0,022	0,183	0,022		
cS_39	94	0,00	5	0,043	0,043	0,160	0,574	0,181		
cS_40	94	0,00	5	0,202	0,021	0,574	0,181	0,021		
cS_41	83	11,70	6	0,651	0,205	0,024	0,024	0,012	0,084	
cS_47	94	0,00	5	0,021	0,181	0,574	0,021	0,202		
cS_48	93	1,06	6	0,570	0,022		0,194	0,183	0,011	0,022
cS_50	94	0,00	3	0,021	0,585	0,394				
cS_51a	94	0,00	5	0,596	0,202	0,021	0,053	0,128		
cS_51b	94	0,00	3	0,574	0,383	0,043				
cS_51c	94	0,00	3	0,574	0,223	0,202				
cS_52	94	0,00	4	0,181	0,021	0,596	0,202			
cS_53	94	0,00	3	0,202	0,617	0,181				
cS_54a	84	10,64	5	0,226	0,643	0,048	0,060	0,024		
cS_54b	94	0,00	4	0,021	0,181	0,202	0,596			

Tableau 2 : Détails des 10 haplotypes chloroplastiques identifiés

Haplotype	A	B	C	D	DE1	E	F	G	H	HI1	HI2	I	J
Espèce	S	S	M	M	M	M	M	C	C	C	C	C	C
4	101	101	102	102	102	102	104	103	103	103	103	103	103
8	102	103	103	103	103	103	101	104	104	104	104	104	104
15	102	101	103	103	103	103	104	105	105	105	105	105	105
17	101	101	101	101	101	101	102	101	101	101	101	101	101
18	104	101	103	103	103	103	102	105	105	105	105	105	105
20	101	103	104	104	104	104	102	102	102	102	102	102	102
21a	104	104	101	101	101	101	102	103	103	103	103	103	103
21b	101	101	102	102	102	102	103	101	101	101	101	101	101
25	103	102	105	105	105	105	104	101	101	101		101	101
27	102	101	102	102	102	102	103	104	104	104	104	104	104
28a		104	102	102	102	102	101	103	103	103	103	103	103
28b	105	102	103	103	103	103	104	101	101	101	101	101	101
28c		105	102	102	102	102	101	104	104	104	104	104	104
33a	101	102	104	104	104	104	103	105	105	105	105	105	105
33b	104	102	105	105	105	105	101	103	103	103	103	103	103
36	101	104	103	103	103	103	103	102	102	102	102	102	102
38a		102	101	101	101	101	101	101	101	101	101	101	101
38b		105	104	104	104	104	103	101	101	101	101	101	101
39	104	102	105	105	105	105	102	101	103	103	103	103	103
40	103	102	104	104	104	104	105	101	101	101	101	101	101
41	101	103	102	102	102	102	104	106	105			106	
47	103	104	102	102	102	102	101	105	105	105	105	105	105
48		107	105	105	105	105	102	104	104	104	104	104	106
50	102	103	103	103	103	103	101	103	103	103	103	103	102
51a	101	103	104	105	105	105	101	102	102	102	102	102	102
51b	101	103	102	102	102	102	103	102	102	102	102	102	102
51c	101	102	102	102	102	102	102	103	103	103	103	103	103
52	103	103	101	101	101	101	102	104	104	104	104	104	104
53	102	102	103	103	103	103	102	101	101	101	101	101	101
54a	102	103	104	104		105	103	101	101	101	101	101	101
54b	104	104	102	102	102	102	101	103	103	103	103	103	103

Parmi ces 94 génotypes, il y a 41 *C. sativa*, 7 *C. crenata*, 17 *C. mollissima* et 21 hybrides entre *C. sativa* et *C. crenata* (Larue et al. 2021b). Le nombre d'allèles moyen est de 1,8 chez *C. sativa*, 1,0 chez *C. crenata*, 2,0 chez les *C. mollissima*, et 1,9 chez les hybrides entre *C. sativa* et *C. crenata*. Au total, 7 locus sont fixés (un seul allèle présent) chez *C. sativa*, 30 chez *C. crenata*, 3 chez *C. mollissima* et chez les hybrides entre *C. sativa* et *C. crenata* (Tableau Supplémentaire 5).

Nous avons identifié 10 haplotypes chloroplastiques parmi ces 94 individus (tableau 2). Chaque haplotype reçoit une lettre unique (ex : D). Lorsqu'il n'est pas possible d'identifier complètement un haplotype à cause de données de génotypage incomplètes, un code composite est utilisé (ex : DE1). Nous avons identifié deux haplotypes chez *C. sativa* : A et B ; quatre haplotypes chez *C. mollissima* : C, D, E, F et deux haplotypes chez *C. crenata* : G et HI1 (tableau 3). Tous ces haplotypes sont donc spécifiques. Chez les espèces pures de la collection, on trouve des arbres mâle-stériles uniquement chez *C. sativa*, où ils sont fréquents (près de la moitié des arbres ; cf. tableau 3 : 19 astaminés et 20 longistaminés). Tous ces arbres mâle-stériles ont l'haplotype A, le plus fréquent.

Tableau 3 : Type de fleurs et nombre d'individus pour haplotypes. Les résultats pour les espèces pures sont présentés à gauche, et les résultats pour les hybrides sont représentés à droite.

Haplotypes	Espèces	Types Fleurs	# Ind	Haplotypes	Espèces	Types fleurs	# Ind
A	S	S	19	A	SC	S	7
A	S	F	20	A	SC	F	3
B	S	F	2	A	SM	S	3
C	M	F	3	A	SM	F	1
D	M	F	2	A	SxSC	F	1
DE1	M	F	8	C	MC	F	1
E	M	F	2	C	MCxC	F	1
F	M	F	2	H	(CxCM)xS	F	1
G	C	F	4	HI1	CS	F	4
HI1	C	F	3	HI1	CSxM	F	1
				HI2	CSxSC	F	1
				I	CS	F	4
				J	CSxSC	F	1

Les informations notées sur le registre d'introduction INRAE pour les hybrides interspécifiques sont résumées dans le tableau 4. Parmi ces arbres génotypés, on retrouve les parents de trois croisements et 8 de leurs descendants : Ca 105 × Ca 04, Ca 109 × Ca 04 et Ca 107 × Ca 75. Les descendants de ces croisements reçoivent toujours l'haplotype de la mère (8 cas sur 8), indiquant que les chloroplastes sont principalement transmis maternellement chez le châtaignier.

En faisant l'hypothèse d'une transmission maternelle du génome chloroplastique et d'une spécificité complète des haplotypes chloroplastiques, on peut inférer le sens des croisements ayant donné les hybrides interspécifiques (tableau 3). Les hybrides ont été renommés en indiquant en premier l'espèce de la mère, c'est-à-dire l'espèce correspondant à l'haplotype chloroplastique trouvé, supposé d'origine maternelle. Trois nouveaux haplotypes sont identifiés chez des hybrides : HI est subdivisé en H et I, et

un nouvel haplotype J est caractérisé (tableau 3). Ces haplotypes proviennent très probablement de *C. crenata* vu leurs similarités avec les variants chloroplastiques trouvés chez cette espèce (tableau 2).

On ne trouve des descendants mâle-stériles que quand la mère est un *C. sativa* mâle-stérile : c'est bien le cas chez les hybrides *C. sativa* × *C. mollissima* (3 cas /4, tableau 3) et chez les hybrides *C. sativa* × *C. crenata* (7 cas /10 ; tableau 3). Au total, sur 14 descendants, quand la mère du croisement est un *C. sativa* mâle-stérile, 10 hybrides sont mâle-stériles, tandis que 4 sont mâle-fertiles, ce qui laisse penser que des mécanismes de restauration de la fertilité opèrent. Dans les données disponibles, il n'y a pas d'informations concernant la ségrégation de ce caractère dans une descendance issue de mère *C. sativa* mâle-fertile. Par contre, il n'y a pas d'hybrides mâle-stériles lorsque le père est un *C. sativa*, que la mère utilisée pour le croisement soit un *C. crenata* ou un *C. mollissima* (0 cas /12, tableau 3).

Si on reprend les données du registre d'introduction INRAE, en faisant l'hypothèse de spécificité des marqueurs, Vignols serait un croisement *C. crenata* × *C. sativa*, et non l'inverse, et Rihei serait un croisement *C. mollissima* × *C. crenata*, et non l'inverse. Après consultation des archives INRAE, la mère de Vignols est effectivement un *C. crenata*. Les informations disponibles pour les 16 autres croisements sont congruentes avec l'information apportée par les marqueurs chloroplastiques, confortant ainsi l'hypothèse d'hérédité maternelle de l'ADN chloroplastique. En particulier, tous les hybrides mâle-stériles sont bien issus d'un croisement où la mère est un châtaignier européen (8 cas sur 8, tableau 4). Le nombre de génotypes utilisés pour ces croisements est très faible, car CA109 est la mère de 7 des 11 croisements dont on connaît les parents (tableau 4), et seulement deux génotypes, CA04 et CA75, sont utilisés comme pères.

Quatre variétés mâle-stériles (mésotaminées) et deux variétés mâle-fertiles (longistaminées) sont issues des descendants d'un même croisement : CA109 (mésostaminée) par CA04 (longistaminée). Une variété mâle-fertile (longistaminée) est issue du croisement de CA105 (astaminée) par CA04. Deux variétés mâle-stériles (brachystaminées) ont été sélectionnées parmi les descendants du croisement CA102 (brachystaminée) par CA04 (longistaminée). Et une variété mâle-stérile (astaminée) a été sélectionnée parmi les descendants du croisement CA109 (mésostaminée) par CA75 (longistaminée). Trois descendants de deux croisements sont donc mâle-fertiles alors que les deux mères utilisées pour ces croisements sont mâle-stériles (CA109 et CA105).

Sur les 42 châtaigniers évalués dans la forêt de Fragas do Eume, nous avons identifié 1 arbre astaminé (figure 3), 1 brachystaminé (figure 4), 4 mésostaminés et 36 longistaminés. Cela veut dire que 86 % des arbres observés sont mâle-fertiles, 14 % présentent à des degrés divers une stérilité mâle et au moins un arbre serait complètement mâle-stérile. Dans les Aldudes, les 30 châtaigniers étudiés étaient tous longistaminés et donc a priori mâle-fertiles.

Tableau 4 : Extrait du registre d'introduction INRAE concernant les hybrides inter-spécifiques

ID	Haplotype	# INRAE <sup>1</sup>	Nom registre <sup>2</sup>	Croisement <sup>3</sup>	Sens indiqué <sup>4</sup>	Sens prédit <sup>5</sup>	Fleurs	Fécondité
A62Js	C	598	'Rihei'		C x M	M x C	L	F
A71Rs	I	7	'Marsol'	Hybride naturel	C x S	C x S	L	F
E46N	I	15	'Marigoule'	Hybride naturel	C x S	C x S	L	F
E38T	I	48	'Précoce Migoule'	Hybride naturel	C x S	C x S	L	F
E35U	HI1	74	'Maraval'	Hybride naturel	C x S	C x S	L	F
E74A	HI1	728	'Primato' T0 619		C x S	C x S	L	F
A55S1	HI1	43	'Vignols'	Hybride naturel	S x C	C x S	L	F
A55S2	A	116		CA109 [M] x CA04 [L]	S x C	S x C	M	S
E67J	A	117		CA109 [M] x CA04 [L]	S x C	S x C	M	S
A66Qs	A	118	'Marlhac'	CA109 [M] x CA04 [L]	S x C	S x C	M	S
E65H	A	119		CA109 [M] x CA04 [L]	S x C	S x C	L	F
E53C	A	120		CA109 [M] x CA04 [L]	S x C	S x C	L	F
E51I	A	122	'Marissard'	CA109 [M] x CA04 [L]	S x C	S x C	M	S
A60Qs	A	124	'Maridonne'	CA105 [A] x CA04 [L]	S x C	S x C	L	F
A58Os	A	125	'Bouche de Betizac'	CA102 [B] x CA04 [L]	S x C	S x C	A	S
A45Ds	A	126		CA102 [B] x CA04 [L]	S x C	S x C	A	S
E64O	A	128		CA115 [?] x CA75 [L]	S x M	S x M	A	S
E65P	A	123		CA109 [M] x CA75 [L]	S x M	S x M	A	S

<sup>1</sup> Numéro d'accession INRAE, identifiant unique donné à l'échantillon lors de son inscription sur le registre

<sup>2</sup> Nom de la variété inscrit sur le registre INRAE.

<sup>3</sup> Le type de fleur de chaque parent est indiqué entre crochets : [A] = Astaminé / [B] = Brachystaminé / [M] = Mésostaminé / [L] = Longistaminé. Les trois premiers sont considérés comme mâle-stériles, et seul les [L] seraient complètement mâle-fertiles

<sup>4</sup> Espèces des parents, utilisés pour le croisement, inscrites sur le registre d'introduction INRAE

<sup>5</sup> Sens du croisement inféré dans l'hypothèse d'une transmission maternelle du génome chloroplastique

## DISCUSSION

La stérilité mâle du châtaignier est un sujet peu étudié, même si les variétés mâle-stériles sont souvent utilisées dans la castanéiculture européenne. Ainsi, dans le verger conservatoire INRAE, qui reflétait les priorités pour la sélection de matériel génétique en France, 19 des 41 variétés de *C. sativa* sont mâle-stériles. De même, on ne disposait pas avant ce travail d'information sur l'hérédité du génome chloroplastique ou mitochondrial dans le genre *Castanea*. L'hérédité des chloroplastes chez le châtaignier est donc maternelle, comme cela a été démontré chez le chêne (Dumolin et al. 1995).

Contrairement à Sisco et al. (2014), nous n'avons pas trouvé d'haplotype chloroplastique caractéristique des arbres mâle-stériles : nous avons à la fois des individus mâle-stériles et mâle-fertiles possédant l'haplotype A. Par contre cette stérilité mâle est présente seulement chez les *C. sativa* ou chez les hybrides issus d'un croisement où la mère est un *C. sativa* : nous n'avons pas trouvé d'arbres mâle-stériles chez les deux espèces asiatiques présentes dans la collection, *C. crenata* et *C. mollissima*. De plus, aucun descendant stérile n'a été identifié parmi les hybrides quand le père est un *C. sativa*. Comme l'hérédité du génome mitochondrial est très vraisemblablement maternelle, comme le génome chloroplastique, et que cette stérilité mâle ne se transmet qu'à certains des descendants des croisements dont la mère est un *C. sativa*, nous en déduisons que cette stérilité mâle est d'origine cytoplasmique. A notre connaissance, cette stérilité mâle n'a été trouvée à l'état naturel (hors hybrides inter-spécifiques) que chez *C. sativa* : il faudrait confirmer cette information en examinant un plus grand échantillon de populations sauvages d'espèces différentes de châtaignier.



Figure 3 : Châtaignier astaminé de la forêt de Fragas do Eume. Les chatons unisexués mâles sont tombés avant la pleine floraison, la partie mâle des chatons bisexués est très courtes, et aucune étamine n'est visible.



Figure 4 : Châtaignier brachystaminé de la forêt de Fragas do Eume. La partie mâle des chatons bisexués est en plein floraison et les étamines ne dépassent pas le périanthe des fleurs.

Dans une précédente étude (Fineschi et al. 2000), les auteurs ont caractérisé la diversité chloroplastique de 38 populations de *C. sativa* à travers toute l'Europe et ont identifié seulement 11 haplotypes chloroplastiques, dont beaucoup étaient rares. Ces auteurs n'ont toutefois pas vérifié si les châtaigniers caractérisés étaient tous des individus purs de *C. sativa*. Or, une introgression par du matériel asiatique est fort possible dans les peuplements spontanés de châtaigniers européens proches des vergers. En effet, les espèces *C. crenata* et les *C. mollissima* ont été utilisées depuis le début du vingtième siècle en vergers pour obtenir des hybrides tolérants au chancre et à l'encre (Alcaide et al. 2021).

Nous avons exploré la totalité des zones a priori les plus variables du génome chloroplastique avec ces 31 locus SSR en caractérisant génétiquement la collection INRAE composée de trois espèces de châtaignier et de leurs hybrides, d'origines variées. Nous n'avons identifié que 10 haplotypes, dont seulement deux chez *C. sativa*, qui est pourtant l'espèce possédant le plus de génotypes uniques différents dans la collection INRAE. La diversité de l'ADN chloroplastique des châtaigniers européens est donc très réduite, même en tenant compte du fait que ces séquences chloroplastiques évoluent particulièrement lentement (Frascaria et al. 1993).

La fertilité mâle du châtaignier semble pouvoir être restaurée, car parmi les descendants de plusieurs croisements où la mère *C. sativa* est stérile, on trouve des descendants fertiles. Des mécanismes de restauration impliquant des gènes nucléaires pourraient expliquer cette variation de fécondité mâle entre individus issus d'une même mère et donc ayant a priori les mêmes génomes chloroplastiques et mitochondriaux. La description d'un gradient de fécondité mâle (individus astaminés, brachystaminés, mésostaminés, longistaminés ; voir aussi chapitre 3) suggère que ces mécanismes de restauration peuvent être imparfaits.

Cette stérilité mâle du châtaignier européen est-elle la conséquence de la sélection anthropique ou existe-t-elle naturellement ? Pour répondre à cette question, nous avons commencé à explorer la variation sexuelle dans des refuges glaciaires du châtaignier européen en Galice (14 % d'arbres mâle-stériles à divers degrés) et dans le pays-Basque français (où tous les arbres étaient longistaminés). Plusieurs autres populations ont été étudiées en Espagne (Josefa Fernández-López, Centro de Investigación Forestal de Lourizán, communication personnelle), indiquant une variabilité géographique de la proportion d'arbres mâle-stériles. Nous en concluons que certaines populations de châtaigniers européens seraient naturellement gynodioïques.

Le nombre de génotypes uniques caractérisés chez les *C. crenata* et les *C. mollissima* est faible (7 et 17 individus). Génotyper des individus supplémentaires de ces deux espèces à l'aide de marqueurs chloroplastiques permettrait de mieux caractériser leur diversité génétique. De même, l'échantillonnage de la diversité de *C. sativa*, même s'il est plus conséquent, reflète les priorités de l'ancien programme

d'amélioration de l'INRA et n'est pas représentatif de la diversité de l'espèce. Il est techniquement possible d'associer des SSR nucléaires et des SSR chloroplastiques dans une même expérience de séquençage. En conséquence, si une nouvelle expérience de caractérisation de la diversité chloroplastique de *C. sativa* était envisagée, il serait possible d'affecter les échantillons aux différentes espèces de châtaignier grâce aux marqueurs nucléaires et d'étudier la variation de l'ADN chloroplastique de *C. sativa* sans risque de prendre en compte des haplotypes issus de l'introgression par les espèces asiatiques.

## CONTRIBUTIONS

Les échantillons ont été préparés par Javier Fernández Cruz et Clément Larue. Les extractions d'ADN ont été réalisées par Clément Larue et Javier Fernández Cruz. Les amores ont été dessinées par Benoît Laurent et Olivier Lepais. Le génotypage par séquençage a été réalisé avec le soutien des collègues de la PGTB par Javier Fernández Cruz et Olivier Lepais. La floraison des châtaigniers a été décrite par Clément Larue, Teresa Barreneche, Rémy J. Petit, Josefa Fernández López, Catherine Bodenès, Javier Fernández Cruz, Grégoire Pauly, Marie Rheinheimer. Les résultats ont été analysés par Clément Larue et Rémy J. Petit. Le premier jet de cet article a été rédigé par Clément Larue.

## RÉFÉRENCES

- Alcaide F, Solla A, Cuenca B, Martín MÁ (2021) Molecular evidence of introgression of Asian germplasm into a natural *Castanea sativa* forest in Spain. *Forestry*. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpab030>
- Breisch H (1995) Châtaignes et Marrons. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, Paris, France
- Brown SS, Chen Y-W, Wang M, et al (2017) PrimerPooler: automated primer pooling to prepare library for targeted sequencing. *Biology Methods and Protocols* 2: <https://doi.org/10.1093/biometRICS/bpx006>
- Budar F, Touzet P, De Paepe R (2003) The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. *Genetica* 117:3–16. <https://doi.org/10.1023/A:1022381016145>
- Charlesworth D (2002) Plant Population Genetics: What maintains male-sterility factors in plant populations? *Heredity* 89:408–409. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800193>
- Chase CD (2007) Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial–nuclear interactions. *Trends Genet* 23:81–90. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.12.004>
- Cheng L, Hu G, Huang W, et al (2019) Characterization of the complete chloroplast genome of the endemic wild Chinese tree *Castanea seguinii*. *Mitochondrial DNA Part B: Resour* 4:1165–1166. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1586459>
- Dufay M, Billard E (2012) How much better are females? The occurrence of female advantage, its proximal causes and its variation within and among gynodioecious species. *Ann Bot* 109:505–519. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr062>
- Dumolin S, Demesure B, Petit RJ (1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoret Appl Genetics* 91:1253–1256. <https://doi.org/10.1007/BF00220937>

Fineschi S, Tauchini D, Villani F, Vendramin GG (2000) Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (Fagaceae) throughout southern European countries. Mol Ecol 9:1495–1503. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01029.x>

Frascaria N, Santi F, Gouyon PH (1993) Genetic differentiation within and among populations of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and wild cherry (*Prunus avium* L.). Heredity 70:634–641. <https://doi.org/10.1038/hdy.1993.91>

Gouyon P-H, Denis C (1985) Selfish cytoplasm and adaptation. Structure and functionning of plant populations, Haeck & Woldendorp eds North Holland Publishing Company

Hagemann R (2004) The sexual inheritance of plant organelles. In: Daniell H, Chase C (eds) Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles: Chloroplasts and Mitochondria. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 93–113

Kang M-J, Kim T-D, Lee S-A, et al (2019) The complete chloroplast genome of *Castanea crenata* Sieb. & Zucc. Mitochondrial DNA Part B: Resour 4:3864–3865. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1687038>

Kaul RB (1986) Evolution and reproductive biology of inflorescences in *Lithocarpus*, *Castanopsis*, *Castanea*, and *Quercus* (Fagaceae). Ann Miss Bot Gard 73:284–296. <https://doi.org/10.2307/2399114>

Krebs P, Pezzatti GB, Beffa G, et al (2019) Revising the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) refugia history of the last glacial period with extended pollen and macrofossil evidence. Quaternary Sci Rev 206:111–128. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2019.01.002>

Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021a) An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction. Ann For Sci 78:90. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01104-w>

Larue C, Guichoux E, Laurent B, et al (2021b) Development of highly validated SNP markers for genetic analyses of chestnut species. Conserv Genet Resour. <https://doi.org/10.1007/s12686-021-01220-9>

Laurent B, Larue C, Chancerel E, et al (2020) Microhaplotype genotyping-by-sequencing of 98 highly polymorphic markers in three chestnut tree species. Conserv Genet Resour. <https://doi.org/10.1007/s12686-020-01157-5>

Lepais O, Chancerel E, Boury C, et al (2020) Fast sequence-based microsatellite genotyping development workflow. PeerJ 8:e9085. <https://doi.org/10.7717/peerj.9085>

Lewis D (1941) Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants the equilibrium between females and hermaphrodites to be expected with different types of inheritance. New Phytol 40:56–63. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1941.tb07028.x>

Schnable PS, Wise RP (1998) The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends Plant Sci 3:175–180. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01235-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01235-7)

Shi Y, Hebard FV (1997) Male sterility in the progeny derived from hybridization between *Castanea dentata* and *C. mollissima*. J Am Chestnut Found 11:38–47

Sisco PH, Neel TC, Hebard FV, et al (2014) Cytoplasmic male sterility in interspecific hybrids between American and Asian *Castanea* species is correlated with the American D chloroplast haplotype. Acta Hortic 215–222. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1019.32>

Xu H, Zhang Q, Wang G, et al (2021) The complete chloroplast genome of *Castanea sativa*, an endemic to Europe. Mitochondrial DNA Part B: Resour 6:1300–1302. <https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1907246>

Zhu C, Shi F, Wang M, et al (2019) The complete chloroplast genome of a variety of *Castanea mollissima* “Hongli” (Fagaceae). Mitochondrial DNA Part B 4:993–994. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1580160>

Zulfiqar S, Gao X-X, Sun Y-W, et al (2019) The complete chloroplast genome sequence of Seguin chestnut (*Castanea seguinii*). Mitochondrial DNA Part B: Resour 4:342–343. <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1544047>

# Comment mesurer le succès de la pollinisation du châtaignier ?

## INTRODUCTION

Le nombre de fleurs donnant une graine (*seed set*) ou un fruit (*fruit set*) sert souvent indirectement à estimer le succès de la pollinisation, même s'il dépend également d'autres mécanismes post-pollinisation : la fécondation des ovules puis la formation des graines ou des fruits (Burd 1994). Pour que de tels paramètres informent sur le succès de la pollinisation, il faut disposer d'un échantillon représentatif de fleurs et s'assurer que leur pollinisation correspond à des événements indépendants. Il convient aussi de s'assurer que le paramètre choisi dépende le moins possible d'événements post-pollinisation qui vont dégrader la relation avec le succès originel de la pollinisation. Plusieurs paramètres sont envisageables, mais tous ne sont pas également pertinents pour l'étude de la pollinisation. Tout d'abord, il convient d'éviter des mesures absolues de succès reproducteur, telle la production de graines par plante, qui dépend non seulement du succès de la pollinisation mais aussi de la production de fleurs par plante. Si la plante produit des fruits comprenant plusieurs graines, on peut en principe s'intéresser au nombre d'inflorescences donnant des fruits ou au nombre de graines par fruit. Sur quels critères choisir un indicateur ? En principe, il faudrait mesurer un paramètre dépendant le plus possible de l'apport effectif de pollen fécondant. Selon Ruan et al. (2012), le *fruit set* est défini comme la *transition of an ovary to a growing young fruit*, et le *seed set* comme la *transition from an ovule to a seed upon fertilisation*. En conséquence, une mesure du nombre de graines par fruit devrait être préférable à une mesure de la proportion d'inflorescences donnant des fruits ou à une mesure combinant les deux processus, puisqu'elle dépend en principe plus étroitement de la fécondation de l'ovule. En effet, mesurer un nombre de graines par fruit revient à conditionner l'étude du taux de production de graines au développement effectif d'un fruit. En procédant ainsi, on diminue le risque que des facteurs sans relation avec le succès de la pollinisation, par exemple la quantité de ressources dont dispose la plante-mère pour produire les fruits, soient pris en compte. Pourtant, Burd (1994) conclut que “*there is some indication that, across species, supplemental pollen leads to increased fruit set more often than increased seed set within fruits, pointing to the importance of gamete packaging strategies in plant reproduction*”. Le choix d'un paramètre adapté à l'étude du succès de la pollinisation n'est donc pas trivial et pourrait dépendre du modèle biologique étudié.

La châtaigne est un akène, c'est-à-dire un fruit sec constitué typiquement d'une seule graine par fruit, si on met de côté de rares cas de fruits cloisonnés. Ces fruits sont regroupés par trois au sein d'infrutescences appelées bogues, d'où la possibilité de mesurer deux paramètres distincts liés au succès reproducteur : le taux de remplissage des bogues, c'est-à-dire le pourcentage d'inflorescences femelles formant une bogue (*burr set*), puis au sein de chaque bogue le pourcentage de fleurs formant un fruit, ou

taux de remplissage des bogues (de Oliveira et al. 2001). Pour choisir la mesure la plus adaptée à l'étude du succès de la pollinisation, nous avons estimé pour plusieurs arbres le pourcentage d'inflorescences femelles formant une bogue (*burr set*) ainsi que le pourcentage de fleurs formant un fruit (*seed set*).

Pour mesurer le taux de remplissage, il faut choisir aléatoirement des bogues et compter le nombre de fruits développés qu'elles contiennent. Dans certaines bogues, aucun fruit ne s'est développé. Il semble donc qu'il n'y ait pas d'avortement prématûrément systématique des bogues vides. Néanmoins, nous avons observé que des bogues tombent prématûrément tout au long de l'été, et parmi celles-ci il est fort possible que les bogues vides soient surreprésentées. Selon le mode d'échantillonnage des bogues (précoce ou tardif, ou basé sur l'utilisation de filets permettant de conserver toutes les bogues produites), on risque donc d'aboutir à des estimations différentes du succès de la pollinisation, un point qui mérite d'être examiné si l'on veut pouvoir tirer des conclusions sur le succès de la pollinisation.

En échantillonnant les fruits présents au sein d'une même bogue, le postulat d'indépendance des événements de pollinisation étudiés est-il respecté ? La taille des inflorescences femelles, qui regroupent trois fleurs, est du même ordre de grandeur (5-10 mm) que celle des principaux insectes observés visitant ces fleurs. On peut donc s'attendre à ce qu'un seul insecte contacte les styles de plus d'une fleur lors d'une visite à une inflorescence femelle. Mais dans ces inflorescences, la fleur centrale est généralement plus précoce que les deux fleurs latérales (Larue et al. 2021a). Ce décalage phénologique est peut-être suffisant pour découpler la pollinisation des fleurs au sein d'une même inflorescence.

Dans ce travail, nous cherchons à déterminer si la mesure du taux de remplissage des bogues est préférable à la mesure du taux d'inflorescences donnant des bogues pour étudier le succès de la pollinisation. Nous vérifions ensuite si le nombre de bogues à 0, 1, 2 ou 3 fruits suit une loi binomiale simple, ou si certaines catégories de bogues sont au contraire sur- ou sous-représentées. Enfin, nous cherchons à savoir si la position des fruits dans la bogue (centrale ou latérale) affecte leur probabilité d'être pleins ou vides.

## MATERIELS ET METHODES

### Données utilisées

#### Arbres étudiés

En 2019, sur trois arbres de la parcelle A de la collection INRAE de châtaignier (Larue et al. 2021b), nous avons récolté un grand nombre de bogues tombées au sol sous la canopée des arbres. En 2021, nous avons compté le nombre d'inflorescences femelles sur 30 rameaux de huit arbres de la collection INRAE de châtaignier. Ces rameaux ont été enfermés dans des filets au début de l'été, après la floraison, pour qu'aucune bogue ne soit perdue pendant l'été. Le nombre de bogues a été compté à l'automne ainsi que

le nombre de fruits développés et de fruits vides. Le pourcentage d'inflorescences qui donnent des bogues a été calculé en divisant le nombre de bogues récoltées sur les 30 rameaux par le nombre d'inflorescences comptées au printemps sur ces mêmes rameaux.



Figure 1 : Mesure du taux de remplissage sur un grand nombre de bogues. Les bogues sont classées sur la paillasse en fonction du nombre et de la position des fruits qu'elles contiennent.

### Mesure du taux de remplissage

Pour les deux études décrites ci-dessus, le taux de remplissage a été mesuré comme suit. Pour chaque bogue, nous avons compté le nombre de fruits développés et de fruits vides (figure 2), en distinguant six cas principaux, représentés par des triplets de 0 ou de 1 correspondant aux trois fruits ordonnés dans la bogue selon qu'ils sont vides ou pleins : 000, 100, 010, 110, 101, et 111. Par exemple, une bogue 010 correspond à une bogue où seul le fruit central est développé, tandis qu'un bogue 101 correspond à une bogue à deux fruits présents en position latérale (Figure 2). A noter qu'il n'y a pas de sens de lecture préférentiel des fruits dans une bogue et qu'on ne peut donc distinguer les bogues 100 des bogues 001, ni les bogues 110 des bogues 011. Il existe aussi quelques bogues avec un nombre de fruits différent de trois (rarement moins, parfois plus, notamment en cas d'attaques par le cynips du châtaignier, *Dryocosmus*

*kuriphilus*, un hyménoptère). Ceux-ci ont été notés également (nombre de fruits pleins et nombre total de fruits), sans toutefois prendre en compte la disposition des fruits pleins ou sein de la bogue. Le pourcentage observé de fleurs femelles qui donnent des fruits (*fruit set*) a été calculé en divisant le nombre de fruits développés contenus dans les bogues par le nombre total de fruits (fruits développés + fruits vides, en prenant en compte toutes les bogues, y compris celles ayant moins ou plus de trois fruits).



Figure 2 : Taux de remplissage observé des bogues. En haut, à gauche : aucun des trois fruits de la bogue n'est développé, c'est une bogue 000. En haut, à droite : seul le fruit central est développé, c'est une bogue 010. En bas, à gauche : deux des trois fruits de la bogue sont développés, c'est un fruit latéral et le fruit central, c'est donc une bogue 110. En bas, à droite : tous les fruits de la bogue sont développés, c'est donc une bogue 111.

### Analyses statistiques

Toutes ces variables ont été calculées automatiquement grâce à la fonction *apply()* dans R (R Core Team, 2013).

### Comparaison de taux d'inflorescences donnant des bogues et du taux de remplissage des bogues

Pour étudier la relation entre ces deux variables, nous avons créé un modèle linéaire avec la fonction *lm()*.

### Calcul de la probabilité de pollinisation $P_{pol}$

Pour ajuster une loi binomiale aux données, nous avons exclu les bogues atypiques, contenant moins ou plus de trois emplacements. Pour un arbre donné, les bogues typiques à trois emplacements ayant zéro, un, deux ou trois fruits développés sont notées  $x_0$ ,  $x_1$ ,  $x_2$  et  $x_3$  alors que le nombre total de bogues récoltées est noté  $x_{tot}$ . La probabilité de fécondation  $P_{pol}$  correspond à la proportion de fruits pleins dans le cas de la loi binomiale simple :

$$P_{pol} = \frac{x_1 \times 1 + x_2 \times 2 + x_3 \times 3}{3 \times x_{tot}}$$

Nous avons aussi ajusté une loi binomiale *zero deflated*, en ne prenant en compte que les bogues ayant au moins un fruit développé. Une correction est alors nécessaire pour estimer  $P_{pol}$  :

$$P_{pol} = \frac{3}{2} - \sqrt{\frac{3 \times x_{tot}}{x_1 \times 1 + x_2 \times 2 + x_3 \times 3 - \frac{3}{4}}}$$

### Ajustement de la loi binomiale

Pour le cas de la loi binomiale simple, les probabilités d'avoir des bogues à zéro, un, deux ou trois fruits peuvent alors être calculées :

$$P(X = 0) = (1 - P_{pol})^3$$

$$P(X = 1) = 3 \times P_{pol} \times (1 - P_{pol})^2$$

$$P(X = 2) = 3 \times P_{pol}^2 \times (1 - P_{pol})$$

$$P(X = 3) = P_{pol}^3$$

Pour avoir le taux de remplissage  $TR$  il faut simplement multiplier la probabilité de fécondation  $P_{pol}$  par 100 :

$$TR = P_{pol} \times 100$$

Il faut ensuite multiplier le nombre total de bogues par ces probabilités pour avoir le nombre prédit de bogues à zéro, un, deux ou trois fruits ( $x_{p1}$ ,  $x_{p1}$ ,  $x_{p2}$ ,  $x_{p3}$ ). Le nombre observé de bogues est comparé au nombre prédict à l'aide d'un test du  $\chi^2$ .

### Ajustement de la loi binomiale *zero deflated*

Pour vérifier si la loi binomiale est bien ajustée et si le nombre de bogues prédict correspond au nombre de bogues observé, nous calculons la probabilité d'avoir une bogue à un, deux ou trois fruits sachant que l'on n'observe pas l'événement « bogue à zéro fruit » :

$$P(X = 1 | X \neq 0) = \frac{3 \times P_{pol} \times (1 - P_{pol})^2}{1 - (1 - P_{pol})^3}$$

$$P(X = 2 | X \neq 0) = \frac{3 \times P_{pol}^2 \times (1 - P_{pol})}{1 - (1 - P_{pol})^3}$$

$$P(X = 3 | X \neq 0) = \frac{P_{pol}^3}{1 - (1 - P_{pol})^3}$$

Il suffit alors de multiplier le nombre total de bogues par ces probabilités pour avoir le nombre prédit de bogues à un, deux ou trois fruits ( $x_{P1}$ ,  $x_{P2}$ ,  $x_{P3}$ ). Le nombre observé de bogues à un, deux, et trois fruits ( $x_1$ ,  $x_2$  et  $x_3$ ) est comparé au nombre de bogues prédict ( $x_{P1}$ ,  $x_{P2}$ ,  $x_{P3}$ ) à l'aide d'un test du  $\chi^2$ .

### Comparaison des probabilités de pollinisation des fruits latéraux et centraux

Pour les bogues à un fruit, les proportions attendues sont 2/3 pour les bogues 100/001 et 1/3 pour les bogues 010. Pour les bogues à deux fruits, les proportions attendues sont de 2/3 pour les bogues 110/011 et 1/3 pour les bogues 101. Les effectifs de ces différentes catégories de bogues ont été calculés pour les trois arbres intensivement échantillonnés et comparés aux effectifs attendus à l'aide d'un test du  $\chi^2$ .

## RESULTATS

Au total, nous avons récolté 512 bogues sur l'arbre A42J, 285 bogues sur l'arbre A44Q (les bogues vides n'ont pas été comptées sur cet arbre) et 161 bogues sur l'arbre A60Q (Tableau 1).

Tableau 1 : Nombre de bogues récoltés dans les arbres intensivement échantillonnés.

Arbres	#000	#100	#010	#110	#101	#111	Total	Tx obs
A42J	159	218	66	29	34	6	512	28 %
A44Qs	NA	70	35	72	68	40	285	59 % <sup>1</sup>
A60Qs	6	51	38	44	6	16	161	49 %

<sup>1</sup>Valeur du taux de remplissage surestimée du fait de la non prise en compte des bogues vides.

Concernant les huit arbres dont nous avons suivi la floraison et la fructification en 2021, nous avions compté de 29 à 243 inflorescences femelles sur les 30 rameaux étudiés (Tableau 2). Cette fécondité femelle semble dépendre fortement de la variété (effet non testé). Un des huit arbres est mort durant l'été. Les sept arbres restants ont produit de 14 à 201 bogues et de 44 à 541 fruits, correspondant à des taux d'inflorescences donnant des bogues variant de 48 % à 84 % et à des taux de remplissage des bogues variant de 28 à 96 %.

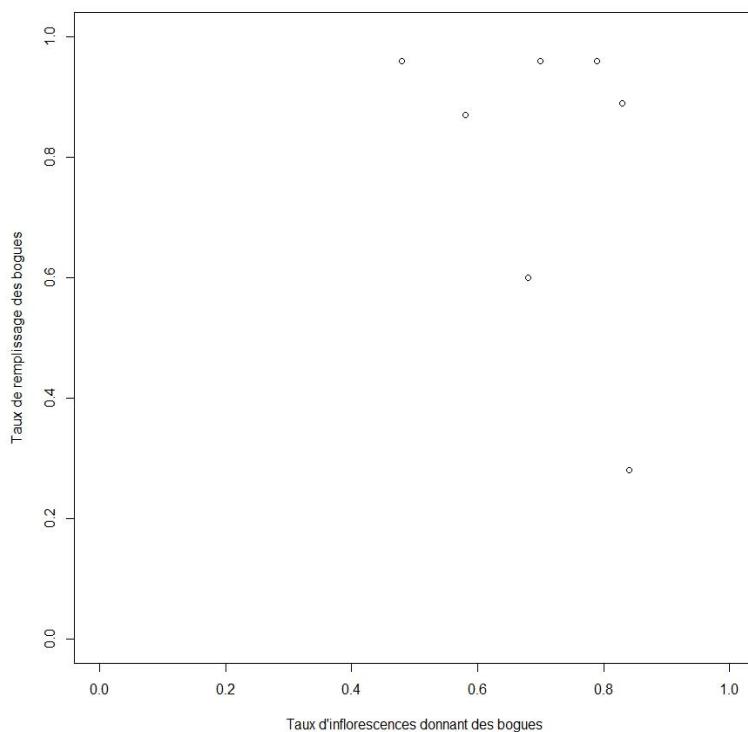


Figure 3 : Relation entre le taux de remplissage des bogues et le pourcentage d'inflorescences donnant des bogues

Tableau 2: Suivi de la floraison et de la fructification de huit arbres en 2021

Ramet	Variété <sup>1</sup>	Sex <sup>2</sup>	#inflo <sup>3</sup>	#bogues <sup>4</sup>	#fruits <sup>5</sup>	#fruits tot <sup>6</sup>	Tx bog <sup>7</sup>	Tx fruits <sup>8</sup>	#0 <sup>9</sup>	#1	#2	#3
E80E	BET	A	57	40	115	120	70 %	96 %	0	0	5	35
E80G	BET	A	29	14	44	46	48 %	96 %	0	0	2	11
E69D	MRC	M	224	178	516	536	79 %	96 %	0	1	18	158
E73D	MRC	M	243	201	541	609	83 %	89 %	1	10	42	144
E53C	C-39	M	184	126	242	402	68 %	60 %	11	27	43	33
E72E	C-39	M	178	103	343	395	58 %	87 %	0	4	17	43
E48F	MRD	L	97	81	76	268	84 %	28 %	34	15	8	4
E50P	MRD	L	107	/	/	/	/	/	/	/	/	/

<sup>1</sup> BET : ‘Bouche de Bétizac’, MRC : ‘Marlhac’, MRD : ‘Maridonne’

<sup>2</sup> Types de fleurs mâles : astaminés (A) / brachystaminés (B) / mésostaminés (M) / longistaminés (L)

<sup>3</sup> Nombre d’inflorescences femelles présents sur les 30 rameaux

<sup>4</sup> Nombre de bogues récoltées sur les 30 rameaux

<sup>5</sup> Nombre de fruits développés contenus dans les bogues récoltées sur les 30 rameaux

<sup>6</sup> Nombre total de fruits contenus dans les bogues récoltées sur les 30 rameaux

<sup>7</sup> Pourcentage d’inflorescences qui donnent des bogues (#bogues/#fleurs)

<sup>8</sup> Pourcentage de fleurs femelles qui donnent des fruits dans les bogues étudiées (#fruits/#fruits tot)

<sup>9</sup> Nombre de bogues vides, suivi du nombre de bogues un, deux et trois fruits

## Relation entre le taux d'inflorescences donnant des bogues et le taux de remplissage

En examinant le taux de remplissage des bogues en fonction du taux d'inflorescences donnant des bogues pour les sept arbres étudiés (figure 3), on n'identifie aucune relation entre ces deux variables (Test F,  $p > 0.35$ ,  $r^2 < 0,01$ ).

## Correction du taux de remplissage

Pour les deux arbres intensivement échantillonnés sur lesquels nous avions systématiquement récolté les bogues vides, les prédictions pour les bogues à zéro, un, deux ou trois fruits diffèrent du nombre de bogues observées (Tableau 3,  $\chi^2, p > 0,66$ ). Par contre, avec le modèle *zero deflated*, les prédictions pour les bogues à un, deux ou trois fruits correspondent bien au nombre de bogues observées (Tableau 4,  $\chi^2, p < 10^{-5}$ ).

Tableau 3 : Nombre de bogues prédit et comparaison avec le nombre de bogues observé en utilisant toutes les bogues (0, 1, 2 et 3 fruits)

Ramet	A_42_J	A_60_Qs	E_80_E	E_80_G	E_69_D	E_73_D	E_53_C	E_72_E	E_48_F
#0 <sup>1</sup>	159	6	0	0	0	1	11	0	34
#1	284	89	0	0	1	10	27	4	15
#2	63	50	5	2	18	42	43	17	8
#3	6	16	35	11	158	144	33	43	4
#01234 <sup>2</sup>	512	161	40	13	177	197	114	64	61
Ppol <sup>3</sup>	0,187	0,399	0,958	0,949	0,962	0,893	0,659	0,868	0,435
p(X=0) <sup>4</sup>	0,538	0,217	0,000	0,000	0,000	0,001	0,040	0,002	0,180
p(X=1)	0,371	0,432	0,005	0,008	0,004	0,030	0,230	0,046	0,416
p(X=2)	0,085	0,287	0,115	0,139	0,105	0,255	0,444	0,299	0,321
p(X=3)	0,007	0,064	0,880	0,854	0,891	0,713	0,286	0,653	0,082
#0_pred <sup>5</sup>	275	35	0	0	0	0	5	0	11
#1_pred	190	70	0	0	1	6	26	3	25
#2_pred	44	46	5	2	19	50	51	19	20
#3_pred	4	10	35	11	158	141	33	42	5
Test <sup>6</sup> $\chi^2$	***	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	***

<sup>1</sup> Nombre de bogues vides, suivi du nombre de bogues à 1, 2 et 3 fruits

<sup>2</sup>. Nombre total de bogues récoltées (somme des 4 catégories précédentes)

<sup>3</sup> Estimation de la probabilité de pollinisation

<sup>4</sup> Probabilité d'avoir une bogue vide, suivi des probabilités d'avoir des bogues à 1, 2 et 3 fruits

<sup>5</sup> Nombre de bogues vides prédit, suivi du nombre de bogues à 1, 2 et 3 fruits prédits

<sup>6</sup> Comparaison des nombres de bogues observés et prédits

Pour les arbres dont les rameaux ont été suivis et les bogues et fruits récupérés grâce aux filets, les prédictions pour les bogues à zéro, un, deux ou trois fruits s'ajustent correctement au nombre de bogues observées pour six des sept arbres (Tableau 3,  $\chi^2, p > 0,4$ ). Concernant l'arbre E48F, le nombre de fruits

prédit ne correspond pas bien au nombre de fruits observé (Tableau 3,  $\chi^2, p < 10^{-4}$ ). En revanche, avec le modèle *zero deflated*, les prédictions pour les bogues à un, deux ou trois fruits s'ajustent bien aux nombres de bogues observées pour les sept arbres étudiés (Tableau 4,  $\chi^2, p > 0,67$ ).

### Indépendance des événements de pollinisation au sein des bogues

Pour l'arbre A42J, les effectifs de bogues observés 100/001 et 010 s'ajustent correctement aux effectifs prédicts (Tableau 5,  $\chi^2, p = 1$ ), de même pour les effectifs des bogues à un fruit de l'arbre A60Qs (Tableau 5,  $\chi^2, p > 0,3$ ). Pour l'arbre A44Qs, le nombre de bogues avec un seul fruit central (010) est supérieur à l'attendu théorique (1/3) (Tableau 5,  $\chi^2, p < 0,02$ ).

Pour les bogues à deux fruits, les effectifs observés s'écartent à chaque fois des effectifs prédicts. Les arbres A42J et A44Qs ont un excès de bogues 101 (Tableau 5,  $\chi^2, p < 0,04$ ), tandis que l'arbre A60Qs a au contraire un déficit de bogues 101 (Tableau 5,  $\chi^2, p < 0,02$ ).

Tableau 4 : Nombre de bogues prédit et comparaison avec le nombre de bogues observé en utilisant uniquement les bogues ayant 1, 2 et 3 fruits

Ramet	A_42_J	A_60_Qs	E_80_E	E_80_G	E_69_D	E_73_D	E_53_C	E_72_E	E_48_F
#1 <sup>1</sup>	284	89	0	0	1	10	27	4	15
#2	63	50	5	2	18	42	43	17	8
#3	6	16	35	11	158	144	33	43	4
#01234 <sup>2</sup>	353	155	40	13	177	196	103	64	27
Ppol <sup>3</sup>	0,187	0,399	0,958	0,949	0,962	0,893	0,659	0,868	0,435
TR_Corr <sup>4</sup>	19	40	96	95	96	89	66	87	44
p(X=1 X≠0) <sup>5</sup>	0,802	0,552	0,005	0,008	0,004	0,030	0,240	0,046	0,508
p(X=2 X≠0)	0,184	0,367	0,115	0,139	0,105	0,255	0,463	0,299	0,391
p(X=3 X≠0)	0,014	0,081	0,880	0,854	0,891	0,714	0,298	0,655	0,101
#1_pred <sup>6</sup>	283	86	0	0	1	6	25	3	14
#2_pred	65	57	5	2	19	50	48	19	11
#3_pred	5	13	35	11	158	140	31	42	3
Test <sup>7</sup> $\chi^2$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

<sup>1</sup> Nombre de bogues à 1 fruit, suivi du nombre de bogues à 2 et 3 fruits

<sup>2</sup>. Nombre de bogues récoltées possédant au moins 1 fruit développé (somme des trois catégories précédentes)

<sup>3</sup> Estimation de la probabilité de pollinisation

<sup>4</sup> Taux de remplissage des bogues corrigé

<sup>5</sup> Probabilité d'avoir une bogue à un fruit sachant que les bogues vides ne sont pas observées, suivi des probabilités d'avoir des bogues à 2 et 3 fruits, sachant que les bogues vides ne sont pas observées

<sup>6</sup> Nombre de bogues à 1 fruit prédict, suivi des nombres de bogues à 2 et 3 fruits prédicts

<sup>7</sup> Comparaison des nombres de bogues observé et prédict

Tableau 5 : Comparaisons des probabilités de fécondation des fruits suivant leur position dans la bogue

<b>Arbres</b>	<b>Effectifs</b>	<b>100/011</b>	<b>010</b>	<b>Chi 2</b>	<b>110/011</b>	<b>101</b>	<b>Chi 2</b>
A42J	Observé	70	35	NS	72	68	*
	Prédit	70	35		93	47	
A44Qs	Observé	218	66	*	29	34	*
	Prédit	189	95		42	21	
A60Qs	Observé	51	38	NS	44	6	*
	Prédit	59	30		33	17	

## DISCUSSION

Les taux d'inflorescences donnant des bogues et le taux de remplissage des bogues ne sont pas corrélés. D'un point de vue théorique, le taux de remplissage, c'est-à-dire le pourcentage de fleurs femelles donnant des fruits, est une mesure plus directe de la qualité de la pollinisation, alors que le taux d'inflorescences donnant une bogue est une mesure indirecte qui pourrait dépendre d'autres facteurs, par exemple, la quantité de ressources disponibles pour la croissance de la bogue. Comme de plus le taux de remplissage est fortement relié au type sexuel des châtaigniers et qu'il est bien plus facile à mesurer que le taux d'inflorescences donnant des bogues, nous nous sommes concentrés sur ce paramètre pour l'étude du succès de la pollinisation.

En ramassant les bogues sous les arbres, on obtient des données qui s'ajustent mal à une distribution binomiale, avec notamment un déficit de bogues vides. En installant des filets autour des rameaux après la floraison, on obtient un meilleur ajustement. Néanmoins, pour l'un des arbres, on a observé un excès de bogues vides, peut-être lié à une difficulté à déterminer si les fruits étaient remplis dans les plus petites bogues ayant arrêté précocement leur développement mais récupérées grâce aux filets. Au contraire, l'utilisation d'une loi binomiale *zero deflated* donne dans tous les cas un très bon ajustement des données avec le modèle pour les bogues ayant un à trois fruits. Ce bon ajustement avec la loi binomiale modifiée semble indiquer que les événements de pollinisation sont bien indépendants. Sinon, on s'attendrait, en cas de pollinisation simultanée de plusieurs fleurs d'une même inflorescence, consécutivement à la visite d'un insecte portant du pollen compatible, à un excès de bogues avec deux ou trois fruits.

Cette hypothèse d'indépendance des événements de pollinisation est confortée par l'étude de la probabilité de fécondation des fleurs centrale ou latérales. Les résultats suggèrent que, selon l'arbre étudié, c'est tantôt la fleur centrale, tantôt les fleurs latérales, qui ont plus de chances d'être pollinisées, démontrant ainsi une forte indépendance de la pollinisation de ces deux types de fleurs sur un même arbre. Nous proposons que le décalage phénologique des deux types de fleurs, combiné à une certaine synchronie de la floraison chez cette espèce qui fleurit massivement, induit des environnements

polliniques différents pour les deux types de fleurs liées à des dates de réceptivité différentes, et donc des probabilités de pollinisation parfois très contrastées. Des analyses de paternité pourraient permettre de mesurer plus précisément la corrélation de paternité intra-bogue. Nos résultats (non présentés ici) indiquent que les fruits d'une même bogue ont fréquemment des pères différents, confortant l'hypothèse d'indépendance de la pollinisation des fruits d'une même bogue.

Le nombre d'arbres utilisés pour ces vérifications est relativement faible et pourrait facilement être augmenté pour préciser ces résultats. Toutefois, il se dégage d'ores et déjà une conclusion assez nette : la mesure du taux de remplissage des bogues corrigée grâce à une loi binomiale *zero deflated* semble fournir une bonne estimation du succès de la pollinisation, si on se base sur l'ajustement aux prédictions pour le nombre de bogues à un, deux et trois fruits. En adoptant cette approche, on a pu caractériser un grand nombre d'arbres. Si on avait suivi l'approche classique basée sur le comptage des fleurs puis des fruits, on n'aurait pas eu les moyens, d'un point de vue opérationnel, de caractériser autant d'arbres. Et surtout, on aurait intégré dans le calcul du *seed set* des inflorescences femelles qui ne se sont pas transformées en bogue, pour des raisons n'ayant rien à voir avec la pollinisation.

## CONTRIBUTIONS

Les comptages de fleurs et les taux de remplissage des bogues ont été mesurés par Clément Larue, Rémy J. Petit, Céline Lalanne, Grégoire Pauly, Marie Rheinheimer, Catherine Bodenière. La modélisation du taux de remplissage a été réalisée par Clément Larue, Domitille Coq—Etchegaray, Etienne Klein et Olivier Lepais. Les résultats ont été analysés par Clément Larue et Rémy J. Petit. Le premier jet de cet article a été rédigé par Clément Larue.

## RÉFÉRENCES

Burd M (1994) Bateman's principle and plant reproduction: The role of pollen limitation in fruit and seed set. Bot Rev 60:83–139. <https://doi.org/10.1007/BF02856594>

de Oliveira D, Gomes A, Ilharco FA, et al (2001) Importance of insect pollinators for the production in the chestnut, *Castanea sativa*. Acta Hortic 269–273. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.561.40>

Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021a) Efficient monitoring of phenology in chestnuts. Sci Hortic 281:109958. <https://doi.org/10.1016/j.scientia.2021.109958>

Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021b) An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction. Ann For Sci 78:90. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01104-w>

R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche. <https://doi.org/URL https://www.R-project.org/>

Ruan Y-L, Patrick JW, Bouzayen M, et al (2012) Molecular regulation of seed and fruit set. Trends Plant Sci 17:656–665. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.005>



# Le taux de remplissage des bogues dépend-il des ressources ?

## INTRODUCTION

Le succès de la pollinisation femelle est défini comme la proportion de fleurs femelles qui reçoivent du pollen apte à féconder leurs ovules (Campbell 1989). En général, vu la difficulté opérationnelle à mesurer ce succès directement, les auteurs procèdent de façon indirecte. Ils estiment la proportion de fleurs femelles qui donnent des graines. En effet, la transformation d'une fleur en graine démontre que la plante avait bien reçu du pollen de qualité en quantité suffisante (Aizen et Harder 2007). Toutefois, cela oblige à faire l'hypothèse que les étapes post-pollinisation de développement de la graine ne modifient pas significativement le succès initial de la pollinisation. En particulier, on doit faire l'hypothèse que la quantité de ressources dont dispose la plante-mère (eau, nutriments...) ne modifie pas fondamentalement le nombre de graines qui se développent, une hypothèse forte (Haig et Westoby 1988). Il convient donc de vérifier, pour l'espèce concernée et dans les conditions de l'étude, que les avortements des graines ou des fruits qui se passent durant leur développement est dû à l'insuffisance ou à la mauvaise qualité du pollen, et non à de trop faibles ressources maternelles. Sinon, en utilisant cette procédure indirecte d'étude du succès de la pollinisation via le comptage des graines, nous risquons de sous-estimer fortement ce succès de la pollinisation.

Dans le cas du châtaignier sur notre site d'étude, la proportion de fleurs donnant des fruits est-elle limitée par les ressources ? Il est bien connu des castanéiculteurs que le poids moyen des fruits dépend des ressources disponibles, notamment la quantité d'eau : c'est ce qui explique que les vergers soient parfois irrigués, afin d'augmenter le rendement. Le poids moyen des fruits produits pourrait donc constituer un indicateur des ressources dont dispose la plante-mère : plus les ressources sont importantes, plus les fruits formés seraient lourds. Pour répondre à la question posée, j'ai donc étudié la relation entre taux de remplissage corrigé des bogues (qui estime le mieux la probabilité d'une fleur à donner un fruit, cf. section 3.3.) et le poids moyen des fruits. Si cette relation était faible ou inexistante, cela indiquerait que les ressources maternelles ont un effet négligeable sur le taux de remplissage. Si par contre le taux de remplissage des bogues augmente significativement avec le poids des fruits, c'est que les ressources conditionnent en partie la formation des fruits et que leur éventuelle hétérogénéité entre arbres au sein du verger risque d'interférer avec notre étude du succès de la pollinisation.

## MATERIELS ET METHODES

Les arbres suivis appartiennent à la collection INRAE de châtaignier de la Grande Ferrade à Villenave d'Ornon (Larue et al. 2021). En 2019, le taux de remplissage des bogues a été mesuré sur tous les arbres

de la collection. Au total, 222 arbres ont produit des bogues. Nous avons prélevé 30 bogues sur chacun de ces arbres et nous avons compté le nombre de fruits développés (sur les trois possibles) dans chaque bogue. Les bogues atypiques, s'étant développées à partir d'inflorescences comptant moins de trois fleurs ou plus de trois fleurs, n'ont pas été prises en compte. En ajustant une loi binomiale *zero deflated* aux données de chaque bogue, il est possible de calculer la probabilité d'avoir une bogue vide puis de calculer un taux de remplissage corrigé, comme expliqué ci-dessus (section 3.3.).

Pour chaque arbre-mère, le poids moyen des fruits a été calculé en pesant à l'aide d'une balance 50 fruits développés (présence de la graine au sein du péricarpe) ramassés à maturité au sol sous l'arbre.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (R Core Team, 2013). Grâce à la fonction *plot()*, nous avons représenté le taux de remplissage des bogues en fonction du poids des fruits. Pour étudier la relation entre ces deux variables, nous avons créé un modèle linéaire avec la fonction *lm()*. Les variations de poids des fruits en fonction du type de fleurs sont représentées avec un boxplot réalisé avec le package *ggplot2*. La significativité de la différence de poids a été vérifié avec une Anova.

Pour visualiser le lien entre poids des fruits et leur position dans la bogue, nous avons choisi en 2019 un arbre du verger (arbre A\_44\_Q, variété 'Marigoule', un hybride *C. sativa* × *C. crenata*) et avons sélectionné les bogues correspondant à cinq catégories décrites précédemment (100, 010, 110, 101, 111). Pour chaque type de bogues, nous avons pesé simultanément 35 à 50 fruits, en distinguant les fruits en position centrale ou latérale, et calculé le poids moyen des fruits.

## RESULTATS

Nous avons pu obtenir des données de taux de remplissage corrigé et de poids moyen des fruits pour 204 arbres. En moyenne, une bogue contient deux fruits développés (0,4 – 3,0) et un fruit développé pèse 9,8 g (0,5 – 30,0 g). Il est possible d'avoir des bogues avec un fort taux de remplissage et des petits fruits, ou des bogues où un seul gros fruit est développé (figure 1). La relation entre le taux de remplissage des bogues et le poids des fruits est légèrement décroissante (Figure 2). En effet, le taux de remplissage diminue légèrement mais significativement quand le poids des fruits augmente (Test F,  $p < 0,01$ ,  $r^2 = 0,04$ ). Le poids moyen des fruits produits par les arbres longistaminés est de 10,6 g tandis que le poids moyen des fruits des arbres astaminés est de 8,2 g (figure 3). La différence est significative (Anova,  $p\text{-value} < 0,001$ ). Concernant le poids des fruits selon leur position dans la bogue, les résultats sont présentés dans la Table 1. Les fruits sont plus lourds quand ils sont seuls dans une bogue que quand il y en a deux ou trois dans la bogue.



Figure 1 : Exemples de remplissage de bogues, avec à droite un exemple d'arbre ayant de petites bogues bien remplies et à gauche un exemple d'arbre ayant de grosses bogues avec peu de fruits qui se SONT développés.

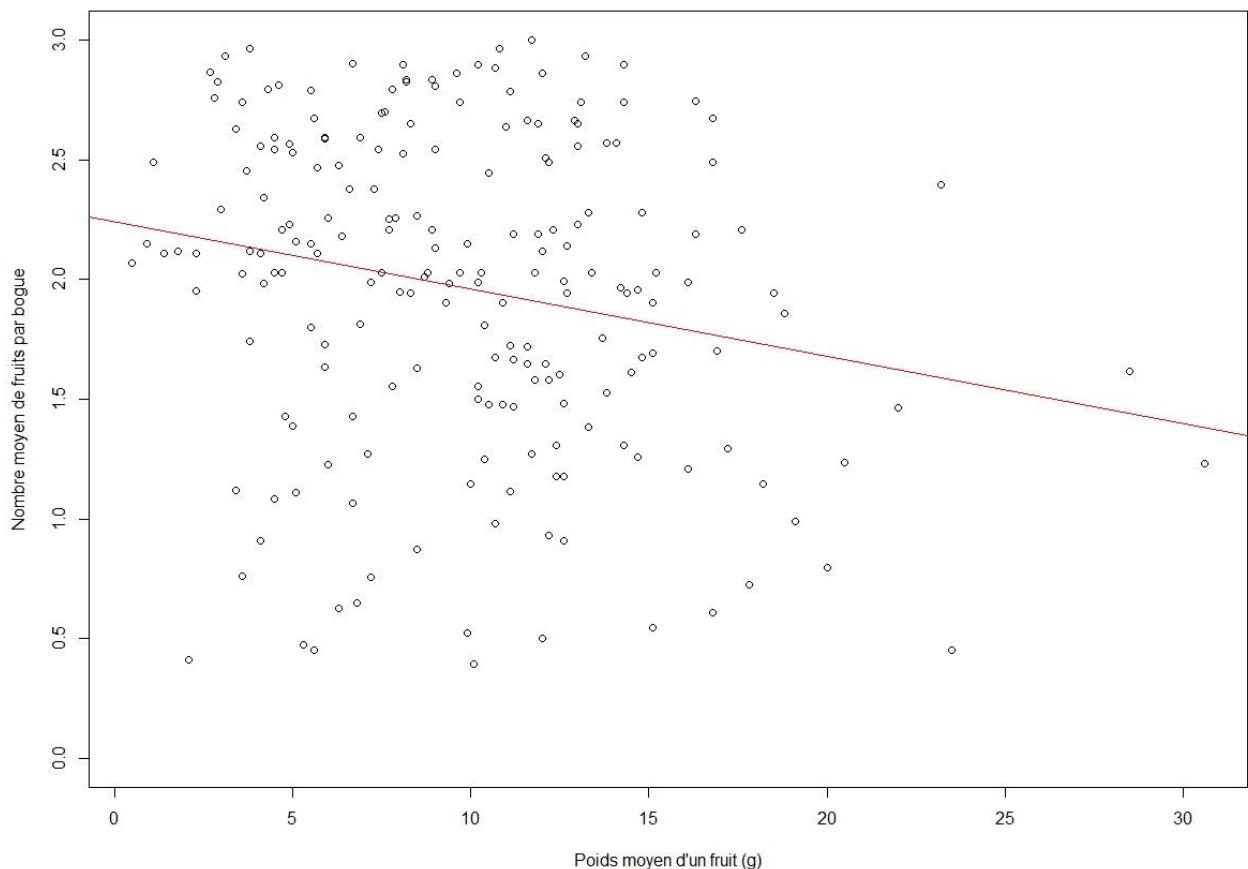
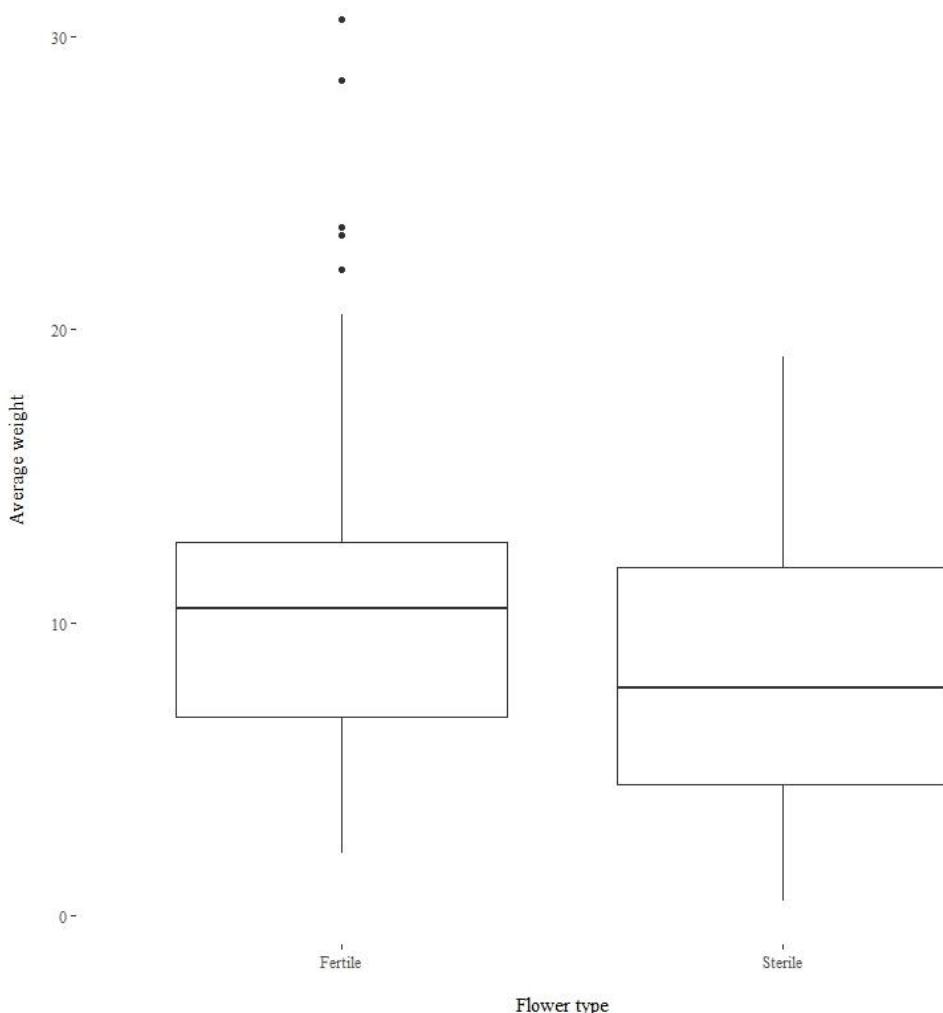


Figure 2 : Représentation graphique du taux de remplissage en fonction du poids des fruits des arbres ( $N=204$ ) : plus le taux de remplissage est fort, plus le poids des fruits est faible.

De plus, les fruits centraux sont plus lourds que les fruits latéraux. L'effet du taux de remplissage sur le poids est plus marqué pour le fruit central : un fruit central est 46 % plus lourd quand il est seul dans la bogue, alors qu'un fruit latéral est 18 % plus lourd quand il est seul dans la bogue. Aucun test n'a été effectué car on ne dispose pas de l'information sur la variabilité entre fruits dans cette étude.



*Figure 3 : Variation du poids des fruits en fonction du type de fleurs. Les arbres longistaminés (mâle-fertiles) sont à gauche et les arbres astaminés (mâle-stériles) à droite.*

*Table 2: Poids moyen des fruits d'un même arbre en fonction du taux de remplissage de la bogue et du type de fruit (latéral ou central).*

Type de bogue	1:0:0	0:1:0	1:0:1	1:1:0	1:1:1
fruit central		14,8		11,9	10,1
fruit latéral	13,3		13,2	12,4	11,3

## DISCUSSION

Nous n'avons pas détecté de relation positive entre le taux de remplissage des bogues et le poids des fruits, comme prédit si les ressources disponibles pour la plante-mère déterminaient le taux de remplissage des bogues. Au contraire, nous avons mis en évidence un effet négatif faible du poids des fruits sur le taux de remplissage des bogues. Il est fort possible que, quand de nombreux fruits se développent sur un arbre, quand la pollinisation a été particulièrement efficace, les ressources disponibles par fruit diminuent, aboutissant à un poids moyen plus faible des fruits. Cette hypothèse post hoc est confortée par l'observation que le poids moyen d'un fruit diminue quand le nombre total de fruits présents dans la bogue augmente, suggérant qu'il y a compétition entre fruits pour les ressources maternelles, au moins au sein des bogues. C'est aussi ce qui est constaté quand on compare le poids des fruits des arbres astaminés et longistaminés, sachant que le taux de remplissage de ces arbres diffère fortement (cf. section 3.5.) : le poids moyen des fruits des arbres astaminés est plus faible que celui des fruits des arbres longistaminés.

Le poids moyen des fruits développés n'est donc pas un indicateur idéal de la quantité de ressources dont dispose l'arbre-mère, puisqu'il dépend du taux de remplissage. Le nombre de fruits qui se développent semblent affecter les ressources dont chaque fruit dispose et donc leur poids. Néanmoins, il semble probable, vu le sens de la relation (négative et non positive), qu'il n'y ait pas d'effet positif des ressources maternelles sur la proportion de fruits qui se développent à partir des fleurs. Couplé avec la démonstration que la pollinisation de chacune des trois fleurs d'une inflorescence est un événement largement indépendant, cela indique que le taux de remplissage des bogues peut être considéré à ce stade comme un indicateur pertinent du succès de la pollinisation.

Pour aller plus loin, il faudrait soit disposer d'une mesure de la quantité de ressources dont dispose les arbres vraiment indépendante du succès de la pollinisation, soit à défaut calculer le poids moyen des fruits mais en n'utilisant que des bogues avec un nombre fixé de fruits, par exemple n'utiliser que les bogues à deux fruits, pour mieux standardiser la mesure. A terme, il serait souhaitable de développer un modèle écophysiologique pour comprendre l'effet des ressources sur le succès de la pollinisation d'une part et sur le poids des fruits d'autre part, sachant que ces deux mécanismes ne sont pas indépendants.

## CONTRIBUTIONS

Les taux de remplissage des bogues ont été mesuré par Clément Larue, Rémy J. Petit, Céline Lalanne et Chantal Helou Bagate. Les analyses et la rédaction du premier jet ont été réalisés par Clément Larue.

## RÉFÉRENCES

- Aizen MA, Harder LD (2007) Expanding the limits of the pollen-limitation concept: effects of pollen quantity and quality. *Ecology* 88:271–281. <https://doi.org/10.1890/06-1017>
- Campbell DR (1989) Measurements of selection in a hermaphroditic plant: variation in male and female pollination success. *Evolution* 43:318–334. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04230.x>
- Haig D, Westoby M (1988) On limits to seed production. *Am Nat* 131:757–759. <https://doi.org/10.1086/284817>
- Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021) An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction. *Ann For Sci* 78:90. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01104-w>
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche. <https://doi.org/URL https://www.R-project.org/>

# Self-interference and female advantage in chestnut

Clément Larue<sup>a,b</sup>, Rémy J. Petit<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univ. Bordeaux, INRAE, BIOGECO, 33610 Cestas, France

<sup>b</sup>INVENIO, Maison Jeannette, 24140 Douville, France

## INTRODUCTION

Plants display an amazing variety of reproductive systems. For example, in andromonoecious and gynodioecious species, cosexual and unisexual individuals coexist. The evolutionary mechanisms leading to the evolution of unisexuality in plants have been discussed for a long time (Darwin 1877), but they are still poorly understood (Dufay and Billard 2012). The question that arises is why cosexuality, in which transmission of genes of an individual can take place via both pollen grains and ovules, should be abandoned in favor of unisexuality, in which transmission of genes can only be assured by one route, pollen grains or ovules (Barrett 2010).

One potential pathway to dioecy is the gynodioecy pathway (Barrett 2002; Dufay et al. 2014). For gynodioecy to evolve in the first place, the genetic control of sex determination plays an important role. Indeed, in the absence of restoration by nuclear genes, all females will have only female offspring if male-sterility is maternally inherited. Hence, any fecundity advantage for these female individuals, however small, implies that their frequency will increase in the population until pollen donors become limiting (Lewis 1941). In gynodioecious species, two mechanisms generating a female advantage are generally cited (Lewis 1941; Barret 2010). The first one is the reallocation of resources from the male to the female function, first proposed by Darwin (1877). The second one, generally considered more important, is the avoidance of inbreeding due to obligate outcrossing in females, a view supported by the rarity of self-incompatible gynodioecious species (Ross 1970; Arroyo et Raven 1975; Dufay et Billard 2012).

However, even if they are a minority, self-incompatible gynodioecious species do exist (Kikuzawa 1989, Dufay et Billard 2012). In such cases, outcrossing is enforced by self-incompatibility and avoidance of inbreeding can be ruled out as the main selective force for the maintenance of gynodioecy. Another mechanism of female advantage that might apply to outcrossing species, but which is rarely mentioned in the literature on the evolution of separate sexes, is the release from sexual interference. Sexual interference between maternal and paternal functions is a relatively understudied mechanism, which can result in gamete wastage and reduced fitness in cosexual plant species (Lloyd et Webb 1986; Barrett 2002). Self-pollination can decrease male and female fitness by reducing pollen export and by diminishing seed set, even in self-incompatible species (de Jong 1993). Two mechanisms are responsible for this negative

interference in self-incompatible plants. First, pollen can clog stigmas and preempt space, thereby reducing the chances for compatible pollen to establish and germinate. For example, Galen et al. (1989) showed with the help of a pollen chase experiment that pollen clogging reduces seed set of *Polemonium viscosum* by 40%. Second, pollen tubes from self-pollen might germinate, grow, penetrate the ovules and make them abort, resulting in ovule discounting. For example, Waser and Price (1991) applied a mix of selfed and outcrossed pollen on flowers of *Ipomopsis aggregata*. They showed that seed set diminished by 42% compared to the situation where only outcrossed pollen was used. These negative effects on seed set are most of the time found in species with late-acting self-incompatibility systems (Seavey et Bawa 1986). Simple emasculation experiments can demonstrate that sexual interference is taking place and results in seed discounting. For instance, de Jong (1992) showed that seed set of emasculated *Ipomopsis aggregata* individuals increased by 20%. As the size of the plant increased, the negative effects of self-pollination increased (de Jong 1993). However, except for the pioneer work of Kikuzawa (1989), working on the self-incompatible gynodioecious shrub *Daphne kamtschatica* in Japan, this mechanism has seldom been shown to drive the evolution of gynodioecy.

The discovery of male-sterile trees in wild chestnuts populations in the Galician mountains (see section 3.2.) raises the question of the maintenance of this sexual polymorphism. Here, we first quantify female advantage in this species by comparing seed set in staminate and astamine varieties from the INRAE chestnuts germplasm collection. Second, we assess the importance of self-pollen interference in an experiment where we emasculate both male-fertile and male-sterile chestnut trees.

## MATERIALS AND METHODS

### Chestnut floral biology

The Fagaceae family includes wind-pollinated tree species such as oaks (*Quercus spp.*) and beeches (*Fagus spp.*) and insect-pollinated species such as chestnuts (*Castanea spp.*) (Larue et al. 2021a). Chestnut trees are characterized by massive blooming and the largest pollen:ovule ratio ever reported in plants (Larue et al. 2021a). They are auto-incompatible (Xiong et al. 2019) but, in rare cases, they can produce self-pollinated seeds. Indeed, this species is characterized by multiple and complex mechanisms that limit self-pollination. At the flower level, chestnuts are monoecious: they have separate male and female flowers. At the inflorescence level, chestnuts are andromonoecious: they produce unisexual male catkins with only male flowers and bisexual catkins composed of one or two female inflorescences associated with a single male catkin, but retain significant herkogamy (Larue et al. 2021a). Chestnuts have a complex phenology called duodichogamy characterized by two peaks of pollen emission, which reduces the risk

of self-pollination but does not eliminate it completely (Hasegawa et al. 2017). Unisexual male catkins are the first to bloom and release huge quantities of pollen, about 97% of the total amount. However, male flowers can still emit pollen when female flowers of the same tree become receptive. For instance, in Japanese chestnut, the great majority (>90%) of pollen deposited on stigmas of female flowers is self-pollen, even though the ultimate rate of self-fertilisation is very low (0.3%) (Hasegawa et al. 2009). Xiong et al. (2019) have demonstrated that self-incompatibility of Chinese chestnut is caused by two mechanisms: first, a prezygotic late-acting self-incompatibility mechanism, with a lower percentage of ovule penetration and double fertilisation in selfed vs. crossed ovules, and second, an early-acting inbreeding depression that results in the abortion of most of the self-fertilized ovules. Hence, the probability to observe ovule discounting following self-pollination in this auto-incompatible mass-flowering species is strong.

In European chestnuts, trees produce very different amounts of pollen, as some are completely or partly male-sterile. This male sterility mechanism is likely of cytoplasmic origin (Sisco et al. 2014, section 3.2.). It causes anomalies to male staminate flowers, ranging from male flowers with fully aborted stamens, to flowers with short stamen filaments that produce scarce amounts of mostly non-functional pollen (Bounous et al. 1992). Interestingly, in chestnuts, male-sterile catkins still produce nectar and attract insects (Larue et al. 2021a).

Chestnut trees are good models to study female advantage and self-pollen interference. First, some preliminary indications exist in the literature that male-sterile chestnut trees have higher fruit set than cosexual ones (Pereira-Lorenzo and Ramos-Cabrera 2004). Second, fruit set can be estimated easily in a large sample of chestnut trees (section 3.4.). Female inflorescences are typically composed of three female flowers located side by side. The inflorescence develops into a burr; in each burr, each of the three flowers, if pollinated, gives a nut (a seed surrounded by a pericarp), and if not pollinated, an empty pericarp. Hence, the proportion of developed fruits per burr provides an indication on pollination success. Third, because male and female flowers of chestnuts are separated, it is technically feasible to test experimentally evaluate the consequences of self-pollen on fruit production, by emasculating trees or branches. There is no need to remove stamens individually as male flowers are grouped together into inflorescences that can be removed as one unit, even in bisexual catkins, where they are located at the distal tip of the catkin.

### Estimating pollination success using measures of fruit set per burr

In chestnut, directly measuring fruit set would imply counting flowers in the spring and comparing with the number of developed fruits in the fall. However, this would be particularly tedious and would imply the inclusion of female inflorescences that never give rise to a burr for reasons unrelated with pollination

success. A more direct assessment of fruit set appears preferable (section 3.3.). In fall, when the fruits ripen, burrs containing zero, one, two or three empty fruits can be found. However, empty burrs can fall prematurely, resulting in an overestimation of seed set if it is assessed in the fall at the time of fruit maturity. To correct for this, a solution is to disregard all burrs with zero fruit, counting only burrs with one, two or three fruits, and then to fit a zero-deflated binomial distribution, assuming that pollination of each of the three flowers in a burr is independent. In this way, estimates of the proportion of unobserved empty burrs can be derived and a corrected fruit set better reflecting pollination success can be obtained.

## Estimation of female advantage

### Study site

To quantify female advantage, we compared fruit set in male-sterile and male-fertile chestnut varieties. The data was gathered in the INRAE chestnut germplasm collection located in Villenave d'Ornon (44.788319 N, -0.577062 E) (Larue et al. 2021b). There are 242 trees (ramets) corresponding to 92 different genotypes (clones) assigned to different chestnut species: the European chestnut *C. sativa*, the Japanese chestnut *C. crenata*, the Chinese chestnut *C. mollissima* and their interspecific hybrids. Among the clones, 62 are male-fertile and 30 are male-sterile, corresponding to 156 male-fertile and 86 (36%) male-sterile ramets.

### Fruit set measures

Using the simplified approach described above, we measured fruit set of all trees from the INRAE chestnut germplasm collection in 2018 and 2019. In 2018, we aimed at assessing at least 20 burrs per tree; in 2019, we targeted at least 30 burrs to increase resolution. We differentiated those trees that did not bear fruits from those trees for which we could not measure fruit set because burrs were already opened and chestnuts had fallen to the ground when we visited the trees. The first case is noted “no burr” whereas the others are noted “NA”. Fruit set was measured in all trees that had produced at least five burrs (i.e.,  $\geq 15$  flowers), corresponding to 196 trees in 2018 and 222 trees in 2019.

## Emasculation experiment

### Study site

To assess the importance of self-interference, we carried out an emasculation experiment and compared fruit set of emasculated trees with that of control trees. This experiment was performed in 2019, in three orchards of INVENIO experimental station in Douville (45.019723 N, 0.614637 W).

### Plant material

We selected six hybrid varieties, three male-sterile ones ('Bellefer', 'OG19' and 'Bouche de Bétizac') and three male-fertile ones ('Florifer', 'Maraval' and 'Marigoule'). They are all hybrids between *C. sativa* and *C. crenata* except 'Bellefer', which is a complex three-way hybrid. These trees are planted in three nearby orchards. The first orchard is composed of 8-year-old trees belonging to 'Bellefer', 'OG19', 'Florifer' and 'Maraval' varieties. The second orchard is composed of 20 m-high adult trees belonging to 'Bouche de Bétizac' and 'Marigoule' varieties. We replicated the experiment on 'Marigoule' variety on a third orchard, because 'Marigoule' is very susceptible to cynips (*Dryocosmus kuriphilus*), which complicates seed set measurement: female flowers tend to proliferate following cynips attacks, resulting in inflorescences with more than three flowers.

## Modalities

There were two modalities: open pollination (control) and emasculation. To remove all the male flowers for the emasculation treatment, we cut all unisexual male catkins and the male part of bisexual catkins with a scissor. As these two types of flowers emerge at different times, we removed all male flowers in three steps before trees started to flower. At the first pass, at the end of May, we removed all unisexual male catkins. At the second pass, we checked if no unisexual male catkins remained and we removed the male part of bisexual catkins. At the first and last pass, we removed the male flowers of bisexual catkins that remained.

For young trees, we applied the modality to entire trees. For each modality, we selected five 'OG19' trees, six 'Florifer' trees, five 'Bellefer' trees and two 'Maraval' trees. Hence, there were 18 control and 18 emasculated chestnuts. For adult trees, in the first orchard, we selected five 'Bouche de Bétizac' and five 'Marigoule' trees. For each tree, we selected 20 branches and used ten for each modality. We replicated these two modalities on three more 'Marigoule' trees from another orchard.

## Statistical analyses

### Data analysis

All analyses were performed with R software (R Core Team 2013). The corrected fruit set was calculated with basic functions implemented in R, while boxplots and histograms are computed with the ggplot package.

### Corrected fruit set

The exact number of burrs with zero developed fruit is difficult to measure because these empty burrs might or not abort during summer. Hence, fruit set measured in the fall will be biased if empty burrs are included. We therefore relied only on burrs that have at least one developed fruit. By adjusting a binomial

zero-deflated distribution to each tree, we can model fruit set and obtain an estimate that will more accurately reflect the probability for a flower to give a fruit.

Burrs of a given tree with one, two and three developed burrs are respectively coded  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$ . The total number of collected burrs is coded  $x_{tot}$ . The probability of fertilisation  $P_{pol}$  is estimated as follows:

$$P_{pol} = \frac{3}{2} - \sqrt{\frac{3 \times x_{tot}}{x_1 \times 1 + x_2 \times 2 + x_3 \times 3 - \frac{3}{4}}}$$

The probabilities to have a burr with zero, one, two or three fruits can be derived as follows:

$$P(X = 0) = (1 - P_{pol})^3$$

$$P(X = 1) = 3 \times P_{pol} \times (1 - P_{pol})^2$$

$$P(X = 2) = 3 \times P_{pol}^2 \times (1 - P_{pol})$$

$$P(X = 3) = P_{pol}^3$$

The corrected fruit set,  $FS_{Cor}$ , considering all burrs (empty burrs included) can then be easily calculated:

$$FS_{Cor} = P_{pol} \times 100$$

All these variables are computed in R using the *apply()* function.

## RESULTS

### Estimation of the female advantage

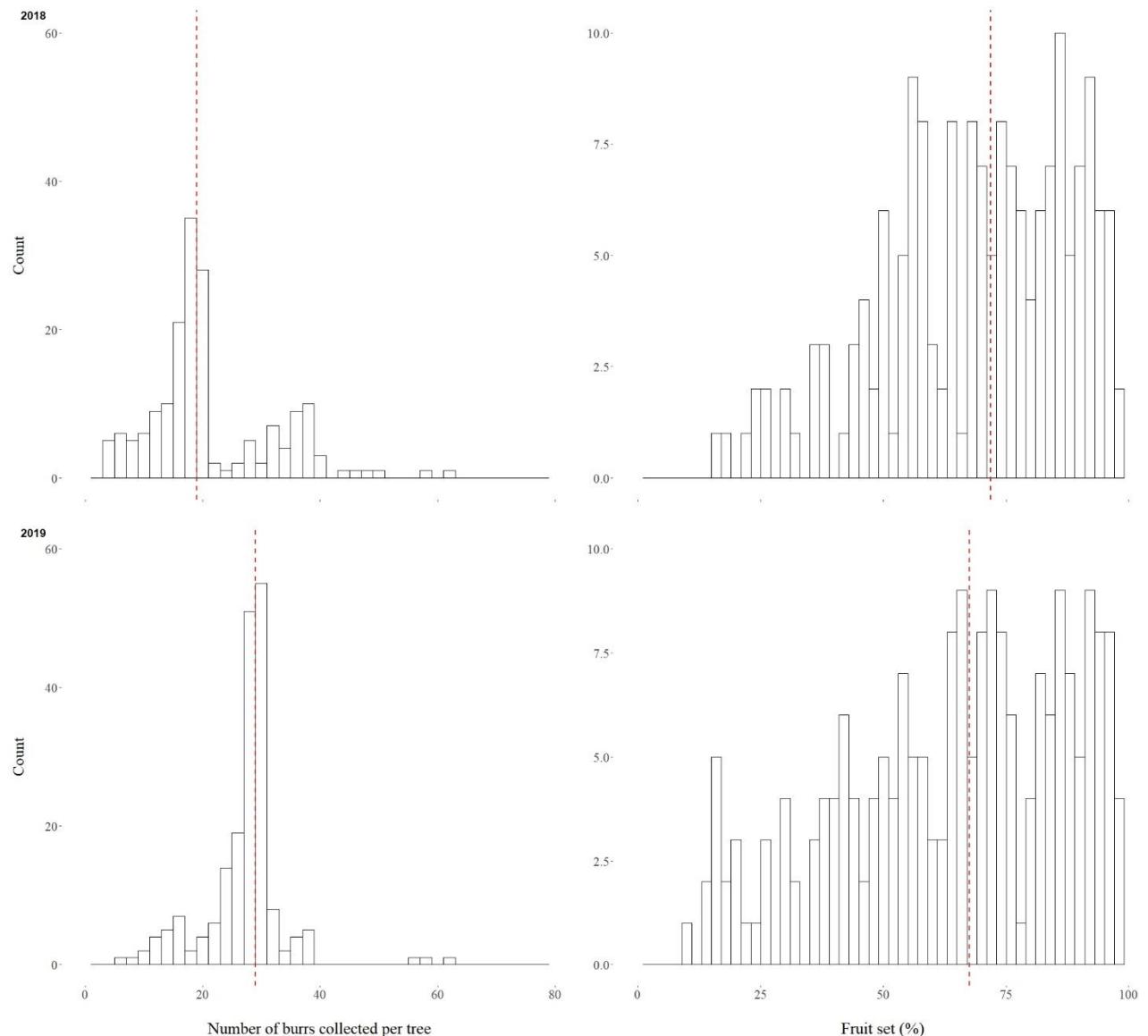
Corrected fruit set was calculated from 176 trees in 2018 and 206 trees in 2019. On average, in 2018, 22 burrs (5-62) were harvested on each tree, and the corrected fruit set was 69% (0% - 100%) while in 2019, on average 36 burrs (6 – 383) were harvested on each tree, and the corrected fruit set was 65% (0% - 100%) (figure 1).

We studied 110 male-fertile and 66 male-sterile trees in 2018 and 134 male-fertile and 72 male-sterile trees 2019. In 2018, the average fruit set of male-fertile trees was 61% and that of male-sterile trees was 82% (figure 2, top). In other words, the fruit set of male-sterile trees was 34% higher than the fruit set of male-fertile trees, a highly significant difference (Anova,  $p < 10^{-11}$ ). In 2019, the average fruit set of male-fertile trees was 55% and that of male-sterile trees was 83% (figure 2, bottom). For a second consecutive year,

the fruit set of male-sterile trees was much higher (+ 51%) than that set of male-fertile trees, a very significant difference (Anova,  $p < 10^{-16}$ ).

## Emasculation experiment

Overall, average fruit set of control male-fertile trees is lower (52%) than that of control male-sterile trees (85%) (figure 3). The emasculation treatment results in a significant decrease in fruit set compared to controls for two of the three male-sterile varieties (figure 3, left). For ‘Bellefer’, fruit set in control trees is 91% whereas it is 81% for emasculated trees, a significantly lower value (F test,  $p < 10^{-5}$ ). Similarly, for



*Figure 1: Distribution of the number of burrs harvested (left) and corrected fruit set (right) for each tree of the INRAE chestnut collection in 2018 (top) and 2019 (bottom). The vertical red dotted line corresponds to the median of the distribution.*

**2018**

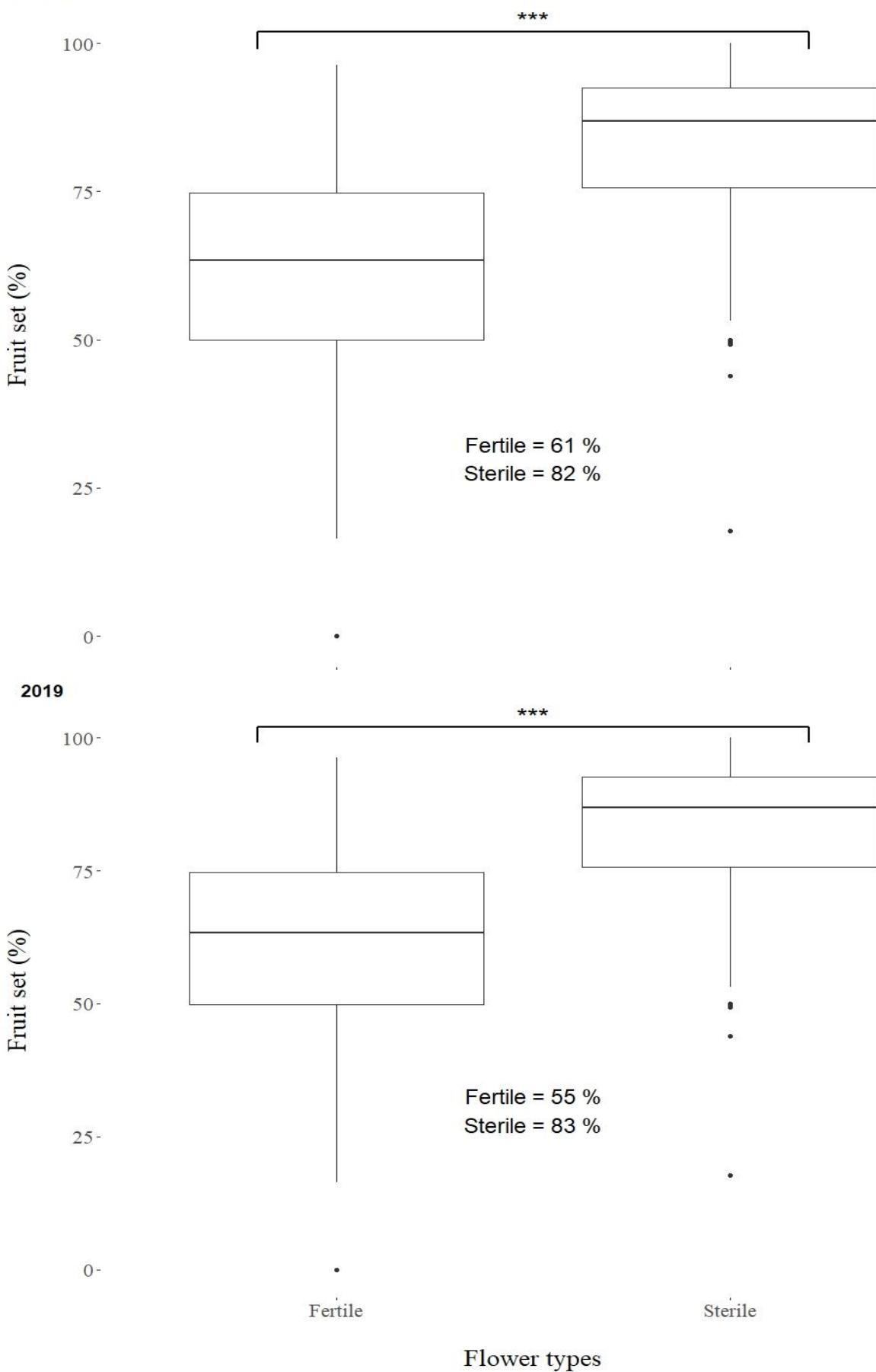


Figure 2: Fruit set of male-fertile (left) and male-sterile trees (right) from INRAE chestnut collection calculated in 2018 (top) and 2019 (bottom)

‘Bouche de Bétizac’, fruit set in control trees is 95% whereas it is 85% for emasculated trees, a significantly lower value (F test,  $p < 10^{-7}$ ). Instead, for ‘OG19’, fruit set in control trees is 77% whereas it is 82% for emasculated trees, a non-significant difference (F test,  $p > 0.82$ ). In contrast to what we had found for male-sterile trees, the emasculation treatment resulted in a significant increase in fruit set compared to controls for two of the three male-fertile varieties (figure 3, right). For ‘Maraval’, fruit set of control trees is 73% compared to 78% for emasculated trees, a non-significant difference (F test,  $p > 0.16$ ). For ‘Marigoule’, fruit set in control trees is 52% whereas it is 67% for emasculated trees, a significant difference (F test,  $p < 10^{-5}$ ). Similarly, for ‘Florifer’, fruit set in control trees is 46% whereas it is 63% for emasculated trees, a significant difference (F test,  $p < 10^{-10}$ ).

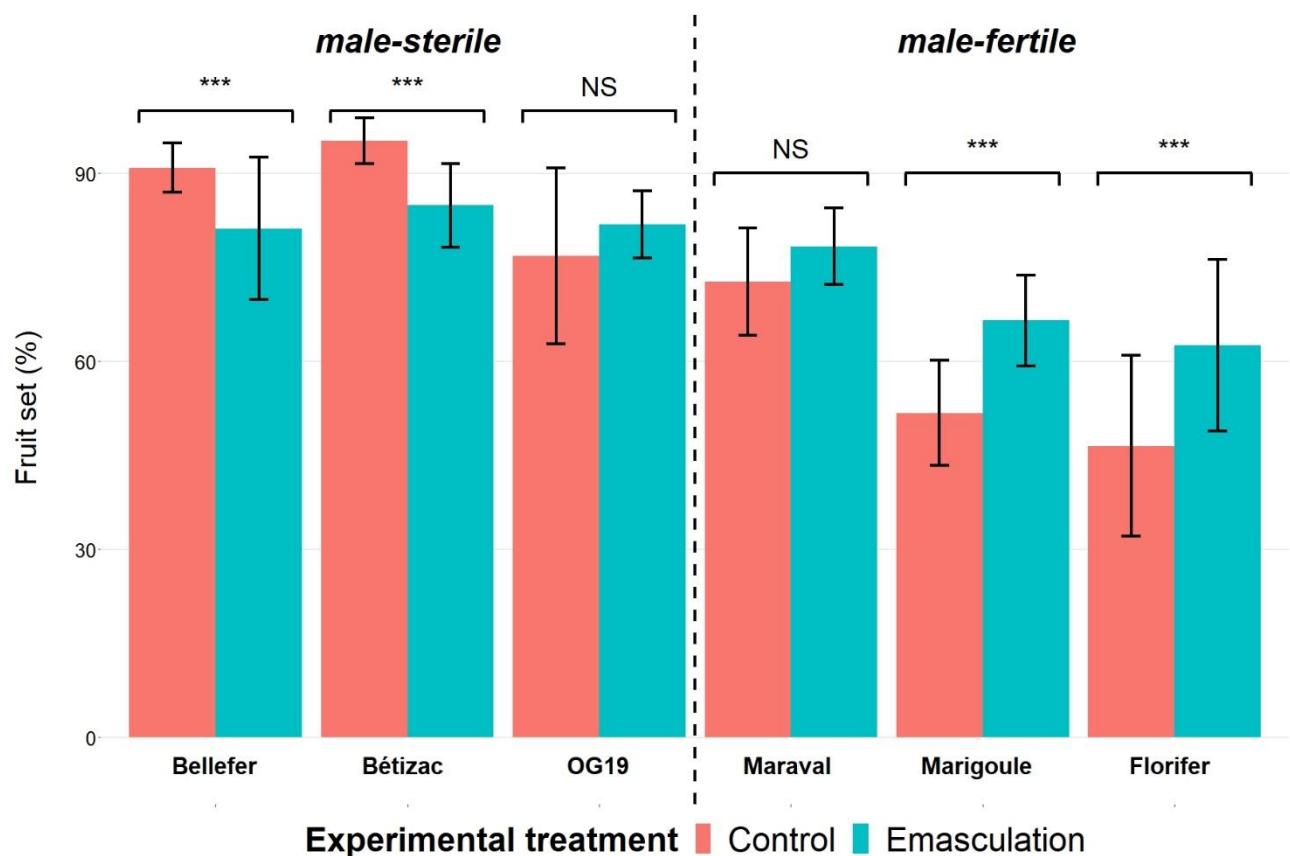


Figure 3: Fruit set of control (red) and emasculated trees (blue). The three male-sterile varieties are on the left and the three male-fertile varieties on the right.

## DISCUSSION

By comparing fruit set of male-sterile and male-fertile trees, we find that male-sterile trees have a strong female advantage over male-fertile ones, because during this two-years study, male-sterile trees produced on average 44.5% more fruits than male-fertile ones (2018: + 34%; 2019: + 55%). Such a fitness advantage would be sufficient to explain the maintenance of male sterility in natural populations,

provided that male sterility is of cytoplasmic origin. Otherwise, a 2-fold advantage would be needed (Lewis 1941). In this data set, different chestnut species are included but this should not affect the conclusions, as we could not find any evidence for differences in fruit set between the different species present in the orchard when controlling for flower types (results not shown).

Results from the emasculation experiment point to a major role for self-pollen interference in this female advantage. When we removed male catkins from male-fertile trees, fruit set increased. We argue that the observed increase in fruit set is due to reduced self-pollination and hence reduced seed discounting. In contrast, when we removed male flowers from male-sterile trees, we slightly reduced fruit set. We argue that this decreased fruit set is due to reduced attractiveness to pollinators caused by the removal of nectar-producing male-sterile catkins, resulting in decreased pollination of the flowers. Together, the findings suggest that in male-sterile trees, self-interference overcomes the effect of reduced insect attractiveness, as the net outcome of these conflicting effects in cosexual trees is increased fruit set. We also note that resource reallocation from the male to the female flowers is unlikely to cause increased fruit set in this experiment. First, we have shown previously that resources do not interfere with fruit set (section 3.3.). Second, the male catkins produced by male-sterile trees do not differ much from catkins of cosexual trees except for the abortion of the tiny stamens. Third, assuming that resource reallocation is involved in the increased fruit set of emasculated cosexual trees, then emasculated male-sterile trees should also have increased fruit weight, unlike what we found. It remains to be investigated if emasculation experiments affect fruit weight.

Overall, our results suggest that self-pollen interference has a strong negative impact on fruit set. It is not the first time that an emasculation experiment is performed in chestnut. Using chemical thinning to remove male catkins from Chinese chestnuts, Zongyun et Kuiying (2009) have shown that fruit yield increases by up to 39%, confirming that self-pollination has a strong negative effect on fruit production, even though chestnut trees are largely self-incompatible. In most modern orchards, only a few varieties propagated by grafting are present. In these cases, pollen grains produced by other ramets of the same clone will have the same negative effect than pollen grains produced by the tree itself.

Interestingly, emasculation experiments of male-fertile trees involving branches or entire trees seemed to work equally well, significantly increasing fruit set. Insects such as beetles, which are particularly abundant in orchards, were seen walking back and forth on the crown, presumably bringing much self-pollen from nearby male catkins on female inflorescences (section 2.4.). By emasculating entire branches, we remove sources of pollen located in the vicinity of female inflorescences and hence self-pollination brought about by the behavior of these insects, but not self-pollination brought about by wind or by insects flying among branches of the same tree. This suggests that insects that tend to walk on inflorescences rather than to

fly from one place to another are major agents of self-pollination and eventually of self-interference and reduced fruit set.

Ovule discounting caused by self-pollination may not be the only mechanism responsible for the increased fruit set of male-sterile trees. We have found indications for more frequent visits of insects to female flowers in male-sterile trees than in male-fertile ones, which could also result in some female advantage. The visit to deceptive female flowers that mimic male flowers could indeed be frequency dependent, being more frequent when male flowers are rare, as suggested before (Larue et al. 2021a).

In conclusion, male-sterile trees have an increased fruit set, at least in part because they largely avoid self-interference, as shown by emasculation experiments, resulting in a strong female advantage. We suggest that this advantage explains the persistence of male-sterile trees in wild population of European chestnut, resulting in the occurrence of gynodioecious chestnut populations. This increased seed set has also been taken advantage of in chestnut cultivation in Europe, as male-sterile varieties are overrepresented compared to male-fertile ones (Furones-Pérez et Fernández-López 2009; Martin et al. 2017; Pereira-Lorenzo et al. 2006).

## CONTRIBUTIONS

Emasculation experiments in Invenio orchards were carried by Clément Larue, Nathalie Lebarbier, Mathieu Mouravy, Christian Gauthier et William Genoud, and fruit set was estimated by Clément Larue and Rémy J. Petit. Fruit set in INRAE chestnut germplasm collection was estimated by Clément Larue, Rémy, J. Petit, Yannick Mellerin, Céline Lalanne and Chantal Helou Bagate. Statistical analyses were performed by Clément Larue and Rémy J. Petit. First draft of this article was written by Clément Larue.

## REFERENCES

- Arroyo MTK, Raven PH (1975) The evolution of subdioecy in morphologically gynodioecious species of *Fuchsia* sect. *encliandra* (Onagraceae). Evolution 29:500–511. <https://doi.org/10.2307/2407262>
- Barrett SCH (2002) The evolution of plant sexual diversity. Nat Rev Genet 3:274–284. <https://doi.org/10.1038/nrg776>
- Barrett SCH (2010) Understanding plant reproductive diversity. Phil Trans R Soc B 365:99–109. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0199>
- Bounous G, Pagietta R, Peano C (1992) Methods for observing chestnut pollen viability, germinability and pollen tube growth. Proc Int Chestnut Conf, Morgantown, USA 76–78
- Darwin C (1877) The different forms of flowers on plants of the same species. London UK
- de Jong TJ, Waser NM, Klinkhamer PG (1993) Geitonogamy: The neglected side of selfing. Trends Ecol Evol 8:321–325. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90239-L](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90239-L)
- de Jong TJ, Waser NM, Price MV, Ring RM (1992) Plant size, geitonogamy and seed set in *Ipomopsis aggregata*. Oecologia

89:310–315. <https://doi.org/10.1007/BF00317407>

Dufay M, Billard E (2012) How much better are females? The occurrence of female advantage, its proximal causes and its variation within and among gynodioecious species. Ann Bot 109:505–519. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr062>

Dufay M, Champelovier P, Käfer J, et al (2014) An angiosperm-wide analysis of the gynodioecy–dioecy pathway. Ann Bot 114:539–548. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu134>

Furones-Pérez P, Fernández-López J (2009) Morphological and phenological description of 38 sweet chestnut cultivars (*Castanea sativa* Miller) in a contemporary collection. Span J Agric Res 7:829–843. <https://doi.org/10.5424/sjar/2009074-1097>

Galen C, Gregory T, Galloway LF (1989) Costs of self-pollination in a self-incompatible plant, *Polemonium viscosum*. Am J Bot 76:1675–1680. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1989.tb15152.x>

Hasegawa Y, Suyama Y, Seiwa K (2009) Pollen donor composition during the early phases of reproduction revealed by DNA genotyping of pollen grains and seeds of *Castanea crenata*. New Phytol 182:994–1002. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02806.x>

Hasegawa Y, Suyama Y, Seiwa K (2017) Flowering phenology of a duodichogamous self-incompatible tree species, *Castanea crenata*. Jpn J Ecol 67:31–39. [https://doi.org/10.18960/seitai.67.1\\_31](https://doi.org/10.18960/seitai.67.1_31)

Kikuzawa K (1989) Floral biology and evolution of gynodioecism in *Daphne kamtschatica* var. *jezoensis*. Oikos 56:196–202. <https://doi.org/10.2307/3565336>

Larue C, Austruy E, Basset G, Petit RJ (2021a) Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea* spp.): an integrated approach. Bot Lett 168:348–372. <https://doi.org/10.1080/23818107.2021.1872041>

Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021b) An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction. Ann For Sci 78:90. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01104-w>

Lewis D (1941) Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants the equilibrium between females and hermaphrodites to be expected with different types of inheritance. New Phytol 40:56–63. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1941.tb07028.x>

Lloyd DG, Webb CJ (1986) The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. Dichogamy. N Z J Bot 24:135–162. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1986.10409725>

Martín MA, Monedero E, Martín LM (2017) Genetic monitoring of traditional chestnut orchards reveals a complex genetic structure. Ann For Sci 74:15. <https://doi.org/10.1007/s13595-016-0610-1>

Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrera AM, Díaz-Hernández MB, et al (2006) Chemical composition of chestnut cultivars from Spain. Sci Hortic 107:306–314. <https://doi.org/10.1016/j.scientia.2005.08.008>

R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche. <https://doi.org/URL https://www.R-project.org/>

Ross MD (1970) Breeding systems in *Plantago*. Heredity 25:129–133. <https://doi.org/10.1038/hdy.1970.13>

Seavey SR, Bawa KS (1986) Late-acting self-incompatibility in angiosperms. Bot Rev 52:195–219. <https://doi.org/10.1007/BF02861001>

Sisco PH, Neel TC, Hebard FV, et al (2014) Cytoplasmic male sterility in interspecific hybrids between American and Asian *Castanea* species is correlated with the American D chloroplast haplotype. Acta Hortic 215–222. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1019.32>

Waser NM, Price MV (1991) Reproductive costs of self-pollination in *Ipomopsis aggregata* (polemoniaceae): are ovules usurped? Am J Bot 78:1036–1043. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1991.tb14511.x>

Xiong H, Zou F, Guo S, et al (2019) Self-sterility may be due to prezygotic late-acting self-incompatibility and early-acting inbreeding depression in Chinese chestnut. J Am Soc Hortic Sci 144:172–181. <https://doi.org/10.21273/JASHS04634-18>

Zongyun Z, Kuiying L (2009) Effect of chemical thinning catkins on Chinese chestnut yield and quality. Acta Hortic 457–460. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.844.64>

# Chapitre 4

---

Système d'appariement et succès de la pollinisation  
en verger







## Préambule

Pour mieux comprendre le fonctionnement reproductif des populations, en verger comme en forêt, il faut pouvoir identifier les donneurs de pollen, grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires et aux analyses de paternité (Ashley 2010). Typiquement, tous les arbres qui fleurissent sont échantillonnés et caractérisés génétiquement, généralement avec des microsatellites ou des SNP. Ensuite, parmi ces arbres, plusieurs arbres mères sont sélectionnés et des fruits y sont récoltés puis caractérisés génétiquement. Une graine possède deux allèles pour chaque locus, un venant de sa mère et l'autre de son père. Comme l'allèle maternel est connu, il suffit d'identifier parmi tous les arbres génotypés lesquels ont pu lui transmettre ce second allèle. Marqueur après marqueur, la liste des pères potentiels diminue (*paternity exclusion*) et un père unique est généralement identifié. Une fois les pères identifiés, il est possible d'étudier leur fécondité mâle et la distance de dispersion du pollen.

La conception des vergers, et notamment le choix des variétés à planter, est déterminant pour leur réussite future. Généralement, plusieurs variétés productrices de pollen sont associées à la variété qui va produire des fruits. Mais dans quelles proportions, et lesquelles privilégier ? Ces variétés doivent être compatibles. Les variétés plantées dans les nouveaux vergers du sud-ouest de la France sont souvent des variétés hybrides *C. sativa* × *C. crenata*. S'il existe des barrières interspécifiques à la reproduction entre hybrides et espèces pures, le succès de la reproduction va dépendre de l'espèce des variétés donneuses de pollen. Cette compatibilité entre variétés est traditionnellement évaluée à l'aide de pollinisations contrôlées : le pollen des différentes variétés est appliqué séparément sur les fleurs des arbre-mères au printemps, les inflorescences étant enfermées dans des sachets, puis le nombre de fruits est compté à l'automne. Mais ces tests de pollinisation ne reflètent pas toujours bien ce qui se passe en verger. De plus, l'efficacité de dispersion du pollen a aussi de lourdes conséquences : si les arbres producteurs de pollen sont très éloignés des arbre-mères qu'ils sont censés polliniser, la production de fruit pourrait être limitée. A ce jour, une seule étude de paternité a été réalisée sur le châtaignier pour mesurer l'effet de la distance des donneurs de pollen sur le rendement (Nishio et al. 2021). Il semble important de plus explorer le nombre et l'efficacité des arbres donneurs de pollen en verger, à l'aide notamment de recherches de paternité, et le succès de la pollinisation mesuré dans ces vergers.

Mais pour aller plus loin, il est nécessaire de passer par des approches de modélisation. Combiner l'étude de la fécondité mâle des plantes, qui est relativement récente (Christopher et al. 2020), et celle du succès de la pollinisation, est l'enjeu central de cette thèse à l'interface entre écologie de la pollinisation et étude du système d'appariement.

Dans le premier article de ce chapitre, intitulé « **Le trop faible nombre de donneurs de pollen limite la production dans les vergers** », je présente les résultats obtenus dans des vergers de producteurs et je montre que plus le nombre de donneurs de pollen est important, c'est-à-dire le nombre de génotypes plantés, plus le taux de remplissage des bogues est élevé. Ensuite, je montre à l'aide d'analyses de paternité que la moitié des fruits sont engendrés par le pollen d'arbres situés à l'extérieur du verger, en partie par des variétés connues propagées par greffe, et en partie par des châtaigniers forestiers.

Dans le second article de ce chapitre, intitulé « **Coupling pollen pool and fruit set models reveals sexual interference in chestnut** », nous modélisons simultanément, pour la première fois, le succès reproducteur mâle et la probabilité pour les fleurs femelles du châtaignier de produire un fruit, en réalisant une analyse de paternité à grande échelle dans la collection INRAE de châtaignier. Celle-ci représente en effet un bon site d'étude, décrit en détail dans le chapitre 1 (Larue et al. 2021). En plus d'identifier les caractéristiques des bons donneurs de pollen, c'est-à-dire les arbres qui sont pères d'un grand nombre de graines, et d'estimer les barrières interspécifiques à la reproduction, nous montrons qu'il est possible de prédire le taux de remplissage des bogues des arbres.

## RÉFÉRENCES

- Ashley MV (2010) Plant parentage, pollination, and dispersal: How DNA microsatellites have altered the landscape. CRC Crit Rev Plant Sci 29:148–161. <https://doi.org/10.1080/07352689.2010.481167>
- Christopher DA, Mitchell RJ, Karron JD (2020) Pollination intensity and paternity in flowering plants. Ann Bot 125:1–9. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz159>
- Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021) An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction. Ann For Sci 78:90. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01104-w>
- Nishio S, Takada N, Terakami S, et al (2021) Genetic structure analysis of cultivated and wild chestnut populations reveals gene flow from cultivars to natural stands. Sci Rep 11:240. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80696-1>

# Le trop faible nombre de donneurs de pollen limite la production dans les vergers

## INTRODUCTION

Le service de pollinisation a un impact direct sur la production de fruits (Reilly et al. 2020). Cette production sera affectée si la quantité et la qualité du pollen produit ne sont pas suffisants (*pollenizer limitation*), ou si les vecteurs de pollen ne sont pas assez efficaces, c'est-à-dire s'il n'y a pas assez d'insectes pollinisateurs pour transporter le pollen des étamines jusqu'aux stigmates des fleurs dans le cas des espèces entomophiles (*pollinators limitation*) (Wilcock et Neiland 2002).

Le châtaignier est une espèce entomophile (chapitre 2) cultivée pour ses fruits. La castanéiculture qui a connu son âge d'or au début du dix-neuvième siècle (Pitte 2014), a considérablement décliné depuis (Eurocastanea et AREFH 2019 ; FAO 2020), avant de se stabiliser dans les années 2000. Elle a même recommencé à augmenter depuis les années 2010 grâce au nouvel intérêt des consommateurs pour des produits régionaux de qualité. Une des solutions pour faire face à cette demande croissante est de planter de nouveaux vergers. Planter un verger soulève en fait de nombreuses questions. Par exemple, d'où provient le pollen qui féconde les fleurs femelles et permet la formation des fruits ? Toutes les variétés sont-elles aussi efficaces pour produire et exporter leur pollen ? Existe-t-il un lien entre le nombre de donneurs de pollen et la production de fruits ?

Le lien entre diversité variétale et rendement en verger a été peu étudié. Deux études chez le pommier montrent que plus le nombre de donneurs de pollen est élevé, plus la production de fruits est importante (Kron et Husband 2006 ; Carisio et al. 2020). Toutefois, le type d'expérimentation utilisé, impliquant l'application de pollen sur les fleurs, est lourd à mettre en œuvre et ne donne qu'une information limitée sur les arbres donneurs de pollen. Les analyses de paternité, de plus en plus utilisées pour explorer le fonctionnement des vergers, pourraient constituer une alternative. Par exemple, chez l'olivier, Mookerjee et al. (2005) ont mis en évidence des échanges de pollen entre différentes variétés et ont identifié celles ayant la plus forte fécondité mâle. Chez le châtaignier, Nishio et al. (2021) ont étudié le lien entre production de fruits et la distance entre les arbre-mères et les arbres donneurs de pollen. Plus les arbres sont distants des variétés productrices de pollen, plus faible est leur production de fruits. La diminution est très rapide, puisque le rendement est divisé par six lorsque ces arbres sont séparés par quatre rangs (16 m) au lieu d'un seul (4 m).

Une limite des études de paternité est liée au fait qu'il est généralement impossible de génotyper tous les pères possibles. En conséquence, seulement une partie des descendants génotypés sont informatifs : ceux

dont le père a pu être identifié. D'une part les analyses perdent en puissance, d'autre part des biais sont possibles si on tente d'interpréter les résultats à partir des seuls fruits dont le père a été retrouvé. Pour éviter cela, une solution consiste à obtenir des informations sur les descendants indépendamment des recherches de paternité, par exemple en tirant parti d'une structuration génétique de la population étudiée.

Le châtaignier européen (*Castanea sativa*) est très sensible à la maladie de l'encre et au chancre de l'écorce. Ces deux maladies ont décimé une partie des forêts et des vergers de châtaignier dans toute l'Europe, et des croisements avec les espèces japonaise (*C. crenata*) et chinoise (*C. mollissima*) ont été entrepris car ces deux dernières sont tolérantes au chancre et à l'encre (Gonthier et Robin 2019 ; Larue et al. 2021a). Ainsi, dans le sud-ouest de la France, les vergers sont composés d'un faible nombre de variétés hybrides de châtaigniers européen et japonais. En pratique, seules deux variétés hybrides ont été massivement plantées pour la production de fruits : Marigoule, un hybride *C. crenata* × *C. sativa*, et Bouche de Bétizac, un hybride *C. sativa* × *C. crenata*. Ces deux variétés hybrides sont de loin les principales variétés productrices dans les vergers de châtaignier de Dordogne et font partie avec Bournette, une autre variété hybride, des seules variétés homologuées pour bénéficier du Label Rouge n° LA n° 02/15 « Marron » (Arrêté LA n° 02-15 2015). Le châtaignier étant fortement auto-stérile (Xiong et al. 2019), si le nombre de variétés pollinisateur plantées n'est pas suffisant, la fécondation croisée pourrait ne plus être assurée. Cela pourrait être aggravé par le fait que toutes les variétés de châtaignier n'ont pas la même capacité à produire du pollen. En effet, certaines sont mâle-fertiles et produisent de grandes quantités de pollen, alors que d'autres sont mâle-stériles, avec des étamines absentes ou réduites qui produisent peu ou pas de pollen (Breisch 1995).

En outre, des barrières à l'hybridation existent entre ces différentes espèces de châtaignier (Section 4.3.) : avec une mère *C. sativa*, les hybrides japonais/européens et les espèces asiatiques sont défavorisés, avec des barrières estimées inférieures à 0,5, c'est à dire que leur pollen est deux fois moins compétitif que le pollen de *C. sativa*. Par contre, sur mère hybride *C. sativa* × *C. crenata*, le pollen de châtaignier japonais est fortement favorisé (il est cinq fois plus compétitif que celui des hybrides), tandis que le pollen de châtaignier européen est défavorisé (barrière estimée à 0,4). Il faudra donc tenir compte de la composition du verger et pas seulement de sa diversité (nombre de variétés) dans l'analyse du succès de la pollinisation.

En principe, les châtaigniers voisins du verger, qu'il s'agisse d'arbres forestiers ou d'arbres champêtres, a priori surtout constitués de châtaigniers européens, ainsi que les arbres présents dans d'autres vergers voisins, pourraient constituer un recours, une forme d'assurance à la pollinisation, pour les vergers plantés avec un trop petit nombre de variétés donneuses de pollen. Toutefois, comme le pollen d'un châtaignier européen arrivant sur une fleur femelle d'un châtaignier hybride japonais/européen est défavorisé, et qu'on s'attend à ce que les arbres forestiers et champêtres installés depuis longtemps dans le paysage

soient essentiellement des châtaigniers européens, ils pourraient en fait ne jouer qu'un rôle mineur dans la pollinisation des vergers de châtaignier hybrides.

En combinant des mesures de taux de remplissage, qui renseignent sur le pourcentage de fleurs pollinisées, des analyses de paternité, qui permettent d'identifier les donneurs de pollen, et des analyses de structure génétique, qui peuvent renseigner sur les espèces de châtaignier impliquées, même quand le père n'est pas identifié, j'ai étudié cinq vergers de production, tous basés sur des variétés hybrides pour la production de fruits. Ces vergers diffèrent par le nombre de variétés plantées et par la présence ou l'absence de châtaigniers forestiers autour du verger. Les questions suivantes seront abordées :

- 1) Le taux de remplissage des bogues augmente-t-il avec le nombre de donneurs de pollen ?
- 2) La composition du verger joue-t-elle sur le succès de la pollinisation ?
- 3) Les châtaigniers sauvages constituent-ils un recours pour la pollinisation des vergers ?

## MATERIELS ET METHODES

### Sites d'études

Pour vérifier si la diversité en donneurs de pollen impacte la production de fruits, cinq vergers de production ont été sélectionnés sur la base de deux critères : (1) le nombre de variétés plantées au sein du verger, et (2) la présence ou non de bois et forêts de châtaigniers autour du verger. Tous les vergers étudiés (tableau 1) se trouvent en Dordogne, autour de Bergerac. Le verger A est composé d'une seule variété, 'Marigoule', une variété mâle-fertile. Il est isolé : il n'y a aucune forêt de châtaigniers à moins de 5 km (figure 1). Le verger B est aussi composé d'une seule variété, 'Marigoule', mais il est entouré de châtaigniers forestiers (figure 2). Le verger C est isolé (figure 3). Il est composé de plusieurs variétés hybrides 'Marigoule', 'Bouche de Bétizac' (une variété mâle-stérile) pour la production de fruits, 'Bournette' (*C. sativa* × *C. crenata*, mâle-fertile), ainsi que des châtaigniers japonais et chinois pour la production de pollen. Toutefois, ces donneurs de pollen sont de petits arbres plantés récemment dans les trouées du verger ou dans le rang le plus à l'extérieur au nord-ouest du verger. Dans le verger D, 'Marigoule' et 'Bouche de Bétizac' sont plantés pour la production de fruits, et de nombreuses variétés longistaminées, hybrides *C. crenata* × *C. sativa* tel 'Maraval', 'Marsol', 'Précoce Migoule', et *C. sativa*, comme 'Marron de Chevanceaux', ont été plantées, ainsi que quelques châtaigniers chinois. Ce verger est aussi entouré par une forêt de châtaigniers (figure 4). Enfin le verger E est composé de 'Marigoule' et 'Bouche de Bétizac' pour la production de fruits. Les donneurs de pollen y sont très nombreux : 68 génotypes différents appartenant à trois espèces de châtaigniers ainsi qu'à leurs hybrides interspécifiques ont été identifiés sur ce domaine arboricole dont la majorité sont des variétés *C. sativa* ou hybrides *C. sativa* × *C. crenata*. De plus, un bois de châtaigniers se trouve au nord-est du verger (figure 5).

## Sélection des arbre-mères

Les arbres sur lesquels les fruits sont récoltés (« arbre-mères ») appartiennent uniquement aux variétés ‘Marigoule’ et ‘Bouche de Bétizac’. La première est présente dans tous les vergers tandis que la seconde est présente dans les vergers C, D et E. Au total, 29 arbres de la variété ‘Marigoule’ ont été sélectionnés : cinq dans les vergers A, C et D, six dans le verger B et huit dans le verger E. Pour la variété ‘Bouche de Bétizac’, 16 arbres ont été échantillonnés : cinq dans les vergers D et E, et six dans le verger C.

Tableau 1 : Informations concernant les vergers échantillonnés

Verger	Producteur	Lieu	Variétés étudiées	# Génotypes <sup>1</sup>	Présence forêt <sup>2</sup>
A	M. Lacoste	Prigonrieux	Marigoule	1	Non
B	M. Duberteix	Siorac de Ribérac	Marigoule	3	Oui
C	M. Feneteau	Saint Pierre d'Eyraud	Marigoule, Bétizac	15	Non
D	M. Gay	Saint Felix de Villadeix	Marigoule, Bétizac	10	Oui
E	Invenio	Douville	Marigoule, Bétizac	68	Oui

<sup>1</sup> Correspond au nombre de génotypes uniques identifiés dans le verger.

<sup>2</sup> Présence de forêts de châtaigniers dans un rayon de 5 km autour du verger.



0 75 150 m

Figure 1 : Le verger A est composé d'une seule variété, Marigoule, et il est isolé.



Figure 2 : Le verger B est composé d'une seule variété, Marigoule, et il est entouré de forêts de châtaigniers.

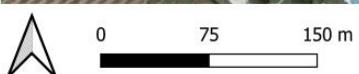


Figure 3 : Le verger C est composé de Marigoule et Bouche de Bétizac pour la production de fruits et de plusieurs variétés émettrices de pollen ; il est isolé.



Figure 4 : Le verger D est composé de nombreuses variétés de châtaigniers. La production de fruits est assurée par Marigoule et Bouche de Bétizac, et il est entouré de forêts de châtaigniers

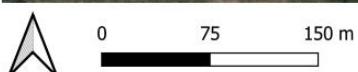


Figure 5 : Vergers expérimentaux d'Invenio (verger E). Ces vergers sont composés de nombreuses variétés de châtaigniers. Le site est entouré de forêts comprenant de nombreux châtaigniers.

## Echantillonnage des arbres adultes

Pour caractériser génétiquement les arbres composant ces vergers, des feuilles sont récoltées sur tous les arbre-mères échantillonnés, sur au moins un arbre de chaque variété connue et sur tous les arbres atypiques indiqués par le propriétaire du verger, c'est-à-dire les arbres dont le phénotype ne semblait pas correspondre à la variété dont le nom figure sur l'étiquette lors de l'achat. L'objectif est d'obtenir une liste de génotypes la plus complète possible rassemblant tous les donneurs de pollen potentiels connus dans le verger. Ces feuilles sont conservées dans un premier temps à +4 °C puis sont rapidement mises en plaques et congelées à -20 °C.

## Mesure du taux de remplissage et sélection des fruits

Le taux de remplissage est mesuré sur chaque arbre-mère par comptage du nombre de fruits développés et avortés dans 20 bogue choisies aléatoirement. Dans les vergers A, B, C, et D, 10 fruits ont été sélectionnés pour chaque arbre-mère, tandis que pour le verger d'Invenio tous les fruits développés sont utilisés. Ces fruits sont stockés en chambre froide à +2 °C et sont ensuite rapidement mis en plaque, puis les échantillons sont conservés à -20 °C.

## Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait à partir de 50 mg de feuilles fraîches ou de châtaigne. Dans le premier cas, il suffit de découper 50 mg de feuilles en évitant les nervures, tandis que dans le second cas, il faut ouvrir le fruit, récupérer le germe et compléter avec du tissu de réserve jusqu'à obtenir le poids voulu. L'ADN est extrait avec un protocole CTAB maison au format plaque 96 (Annexe 1) avec un tampon 1,4 M de NaCl pour les feuilles et 2,5 M de NaCl pour les châtaignes. En effet, ces dernières sont riches en polysaccharides, et sans un protocole spécifique, les solutions sont visqueuses et inutilisables.

## Génotypage

Tous les ADN extraits sont dosés avec un spectrophotomètre Nanodrop 8000 et dilués au robot Hamilton à 15 ng/µL. Pour les arbres des vergers C et D, deux jeux de 39 SNP et 40 SNP (Chapitre 1) sont utilisés pour génotyper les échantillons grâce à la technologie MassARRAY System d'Agena Bioscience. Pour ceux du verger E, trois multiplex de 40 SNP ont été utilisés (Larue et al. 2021b). L'analyse des données brutes a été réalisée à l'aide du logiciel MassARRAY Typer Analyzer 4.0.26.75. Les locus ayant des signaux trop faibles, ou avec une mauvaise séparation des différents allèles, sont éliminés. Grâce à la fonction Autocluster, chaque échantillon est affecté automatiquement à l'une des trois catégories de génotypes (figure 6). Ces affectations automatiques sont vérifiées manuellement, et les échantillons avec des affectations ambiguës sont neutralisés (données manquantes). Les génotypes

uniques sont ensuite identifiés avec la fonction « Multilocus matches » de GENALEX v6.51b2 (Peakall et Smouse 2012).

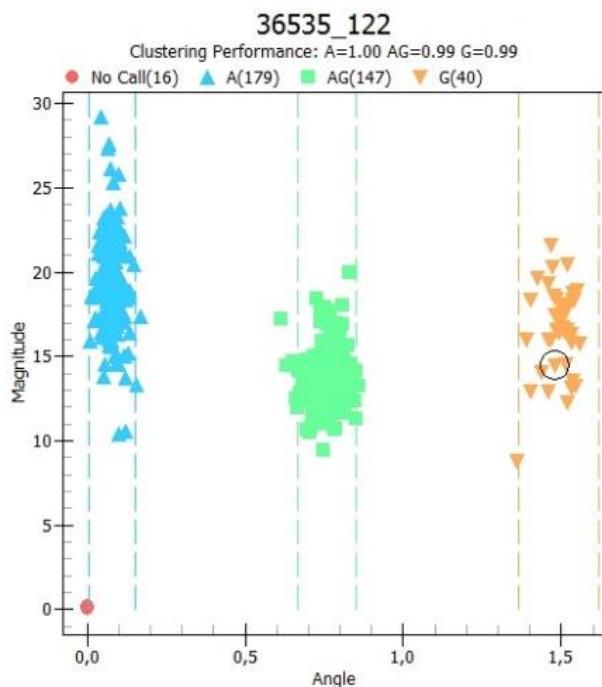


Figure 6 : Lecture des résultats d'un SNP avec MASSARRAY TYPER. Pour chaque marqueur, deux bases sont possibles (ici A et G). Chaque arbre est représenté par un point, et assigné à l'une des trois catégories : homozygote pour l'allèle 1 (ici A/A), hétérozygote (ici A/G) et homozygote pour l'allèle 2 (ici G/G). Un bon SNP est un SNP possédant peu de données manquantes, pour lequel les trois nuages de points sont compacts et bien séparés.

## Analyses

Les analyses des taux de remplissage sont réalisées avec R et les graphiques avec le package ggplot2 (R Core Team, 2013).

Les analyses d'affectation spécifiques ont été réalisées avec le logiciel STRUCTURE version 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). Une première analyse a été réalisée pour affecter les fruits des trois vergers aux différentes espèces de châtaignier. Plutôt que d'utiliser la valeur de coefficient alpha calculée par défaut avec tous les échantillons, source d'imprécisions (Fernández-López et al. 2021), nous calculons un alpha moyen avec les seuls génotypes de référence. Ce coefficient alpha correspond à la valeur avec laquelle débute la chaîne de Markov dans le logiciel STRUCTURE. Un premier jeu de données est utilisé pour calculer alpha : ce fichier regroupe les 64 génotypes appartenant aux espèces pures de la collection INRAE, typés à l'aide de 65 SNP pour les vergers C et D, et 56 SNP pour le verger E. Puis chaque génotype est associé à une espèce : colonne « *putative population* », *C. crenata* est codé 1, *C. mollissima* est codé 2 et *C. sativa* est codé 3. Ces génotypes sont utilisés comme référence pour définir les espèces : les fréquences alléliques sont calculées seulement avec ces 64 génotypes de référence et chaque fruit génotypé est ainsi affecté à l'une des trois espèces de châtaignier. Le fichier de données utilisé contient toutes les variétés de la collection INRAE (64 génotypes d'espèces pures, plus les 30 génotypes hybrides), ainsi que les arbres et les fruits génotypés chez les producteurs pour les vergers C et D, et les 68 génotypes uniques pour le verger E. Les

génotypes hybrides de la collection et les échantillons locaux sont codés 4 pour la colonne « *putative population* », les échantillons de référence sont codés 1 pour la colonne « POPFLAG » tandis que les fruits sont codés 0.

Ces analyses ont été réalisées avec les paramètres par défaut de STRUCTURE, sauf pour le *Ancestry model* où nous avons défini la valeur d'alpha de l'*admixture model* grâce à l'analyse réalisée avec les 64 génotypes de référence (alpha = 0,034). Dans les paramètres avancés, nous précisons que seuls les individus avec POPFLAG = 1 sont utilisés pour calculer les fréquences alléliques des différentes espèces. La valeur de  $K$  a été fixée à trois, et trois chaînes de Monte-Carlo de 200 000 répétitions après une période de *burn-in* de 150 000 répétitions ont été lancés. Les résultats étant très proches, les résultats du *run* avec la plus forte vraisemblance sont utilisés pour cette première analyse exploratoire.

Les analyses de paternité ont été réalisées avec CERVUS version 3.0. Le logiciel CERVUS calcule un LOD score (le logarithme naturel du rapport de vraisemblance) pour chaque père potentiel puis un Delta score pour chaque descendant. Un LOD score positif indique que l'individu étudié a plus de chance d'être le père que de ne pas l'être. Le Delta score est la différence entre le LOD score du père le plus probable et le LOD score du second père le plus probable. Il est calculé seulement si au moins un père potentiel a un LOD score supérieur à 0. Si le père le plus probable a un LOD score positif, et que le delta score est significatif, ce père candidat est désigné comme le père du fruit. Ces affectations sont réalisées avec un seuil de confiance strict de 99 % et un seuil relâché de 95 %. Une analyse a été réalisée pour chaque verger. La liste des pères potentiels utilisée pour les analyses de paternité dans les vergers C et D comprenait les variétés plantées dans le verger étudié et toutes les variétés de la collection INRAE (94 génotypes). L'objectif était de maximiser les chances de repérer des descendants de variétés présentes dans le verger mais non identifiées par le castanéiculteur ou présentes aux alentours du verger (vergers voisins ou arbres champêtres propagés par greffe à partir de variétés traditionnelles). Par contre, la liste des pères utilisée pour le verger E ne comportait que les 68 génotypes du verger E.

Toutes les affectations strictes au seuil de 99 % ont été conservées. Pour les variétés plantées dans le verger, le seuil a été diminué à 95 %. De même, nous avons inclus tous les fruits affectés au seuil 95 % à une variété ayant pollinisé au moins un fruit du verger au seuil 99 %. L'objectif est de diminuer le risque de faux positifs (erreurs dans l'identification du père), tout en limitant le nombre de faux négatifs (pères non identifiés, notamment du fait de l'utilisation d'un seuil trop élevé).

## RESULTATS

### Taux de remplissage

Le taux de remplissage des bogues pour la variété ‘Marigoule’ est croissant dans les cinq vergers classés en fonction du nombre de donneurs de pollen potentiels : il varie de 10 % dans le verger A à 52 % dans le verger E. Le taux de remplissage pour la variété ‘Bouche de Bétizac’ est plus élevé mais il croît de la même manière : il est de 67 % dans le verger C, de 85 % dans le verger D et de 95 % dans le verger E (figure 7). Ainsi, plus le nombre de donneurs de pollen est important, plus le taux de remplissage est élevé : si on compare le verger C et le verger E, le taux de remplissage de ‘Bouche de Bétizac’ augmente de 42 % tandis que celui de ‘Marigoule’ augmente de 56 %. Pour cette dernière variété, le taux de remplissage est multiplié par cinq lorsque les vergers les plus extrêmes (A et E) sont comparés. Par ailleurs, si on compare les taux de remplissage de ‘Marigoule’ et ‘Bouche de Bétizac’ dans les trois vergers où ces deux variétés sont plantées ensemble, le taux de remplissage de ‘Bouche de Bétizac’ est en moyenne deux fois plus élevé que celui de ‘Marigoule’.

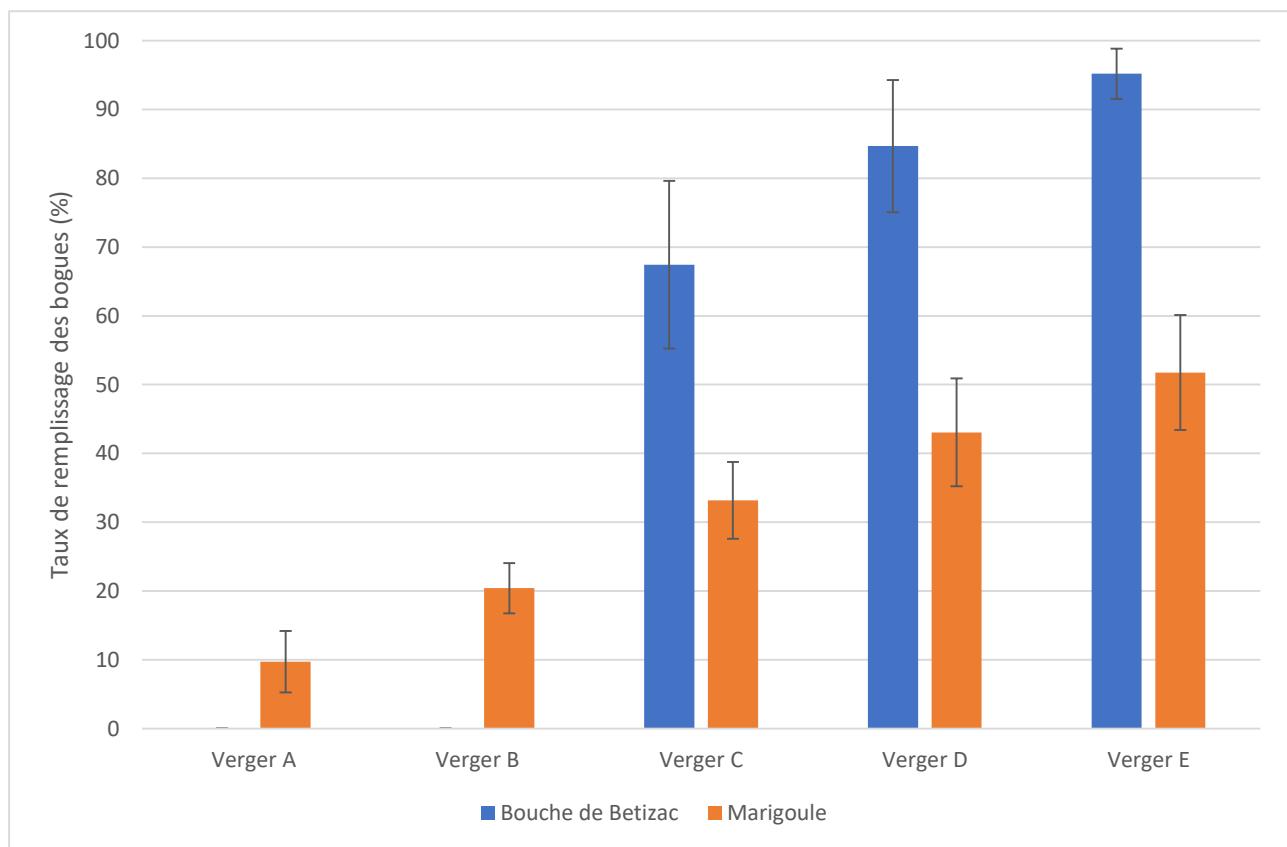


Figure 7 : Taux de remplissage des bogues pour les variétés Bouche de Bétizac et Marigoule dans les cinq vergers de production étudiés

## Analyses de paternité

Aucune erreur d'identification n'a été détectée parmi les arbre-mères avec les analyses génétiques : tous ces arbres sont bien soit des 'Marigoule', soit des 'Bouche de Bétizac'. Au total, sur les 491 fruits récoltés, 450 (92 %) ont été génotypés à plus de 33 SNP et sont conservés pour la suite des analyses (Tableau 2). Les arbres adultes génotypés sont affectés aux différentes espèces et hybrides de châtaignier grâce aux analyses STRUCTURE. Les espèces et les différentes catégories d'hybrides sont désignées par des abréviations : « C » pour le châtaignier japonais (*C. crenata*), « M » pour le châtaignier chinois (*C. mollissima*) et « S » pour le châtaignier européen (*C. sativa*), « CS » pour les hybrides japonais/européen, « CM » pour les hybrides japonais/chinois et « MS » pour les hybrides chinois/européen.

Dans le verger C, 61 % des fruits de 'Bouche de Bétizac' ont été engendrés par le pollen produit par un châtaignier hybride européen/japonais du verger, dont 43 % par 'Marigoule' et 18 % par 'Marsol' (figure 8 et tableau 3). Pour 'Marigoule', par contre, les hybrides européen/japonais du verger n'ont engendré que 27 % des fruits, dont 11 % par 'Marigoule' elle-même, par autofécondation. Les polliniseurs de 'Bouche de Bétizac' situés hors verger représentent 33 % du total, dont 6 % sont des variétés connues utilisées comme référence, alors que pour 'Marigoule' les polliniseurs hors verger sont majoritaires (64 %, dont 20 % appartenant à des variétés connues).

Tableau 2 : Nombre de fruits génotypés

Verger	Variété	# Arbres mères	# Fruits récoltés	# Fruits génotypés	% Fruits génotypés
C	Bétizac	6	60	51	85
C	Marigoule	5	50	44	88
D	Bétizac	5	51	43	84
D	Marigoule	5	50	49	98
E	Bétizac	5	100	95	95
E	Marigoule	8	180	168	93

Dans le verger D, 72 % des fruits de 'Bouche de Bétizac' ont été engendrés par le pollen produit par un châtaignier hybride européen/japonais du verger, dont 49 % par 'Marigoule' (figure 9 et tableau 4). Concernant 'Marigoule', les hybrides européen/japonais du verger ont engendré 43 % de ses fruits. Pour 'Bouche de Bétizac', les arbres situés hors verger ont engendré 26 % du total des fruits, et ce sont tous des arbres anonymes, alors que pour 'Marigoule' les arbres hors verger ont engendré plus de fruits (49 % du total, dont 22 % appartenant à des variétés connues).

Tableau 3 : Génotypes des pères identifiés grâce aux analyses de paternité réalisées sur les fruits de Bouche de Bétizac et Marigoule dans le verger C

Variétés	Espèces	Bouche de Bétizac	Marigoule
<b>'Bouche de Bétizac'</b> <sup>1</sup>	CS	0	0
<b>'Marigoule'</b>	CS	22	5
<b>'Bournette'</b>	CS	0	3
<b>'Marsol'</b>	CS	9	4
'Belle épine'	S	0	1
'Marron de Chevanceaux'	S	0	3
'Marron de Redon'	S	3	0
'Soulage première'	S	0	1
<b>Semis_Crenata_4_F19</b>	CM	3	0
<b>Semis_Mollissima_5_rg2a29</b>	CM	0	1
<b>Semis_Crenata_2_F46</b>	CM	0	0
<b>Semis_Crenata_3_F25</b>	CM	0	0
<b>Semis_Mollissima_6_rg8a8</b>	M	0	1
<b>'Fertil'</b>	M	0	0
<b>Semis_Crenata_1_F51</b>	M	0	0
<b>Semis_Mollissima_2_rg2a11</b>	M	0	0
<b>Semis_Mollissima_3_rg2a17</b>	M	0	0
<b>Semis_Mollissima_4_rg2a23</b>	M	0	0
<b>Semis_Mollissima_8_rg8a26</b>	M	0	2
CA 737	M	0	4
<b>Semis_Mollissima_9_e1276</b>	SM	0	0
# ID		37	25
# Inconnus		14	19
Total		51	44

<sup>1</sup> En gras : variétés du verger

Dans le verger E, les recherches de paternité ont été limitées aux arbres présents dans le verger. Pour les fruits de 'Bouche de Bétizac', 24 % des pères identifiés sont des hybrides européen/japonais dont seulement 2 % engendrés par 'Marigoule' (figure 10 et tableau 3). Pour 'Marigoule', les hybrides européen/japonais du verger ont engendré 31 % des fruits. Pour 'Bouche de Bétizac', les arbres hors verger ont engendré 61 % des fruits, alors que pour 'Marigoule' les polliniseurs hors verger n'ont engendré que 45 % des fruits.

Seule la variété 'Marigoule' s'est autofécondée (5 fruits dans le verger C, 1 fruit dans le verger E). A chaque fois, la variété 'Marigoule' a servi de pollinisateur pour la variété 'Bouche de Bétizac' (de façon importante dans les vergers C et D, beaucoup moins dans le verger E). A contrario, la variété 'Bouche de Bétizac' a très peu pollinisé 'Marigoule' (aucun cas dans les vergers C et D, six fois dans le verger E).

Tableau 4 : Pères identifiés par analyses de paternité des fruits de Bouche de Bétizac et Marigoule récoltés dans le verger D.

Variétés	Espèce	Bouche de Bétizac	Marigoule
<b>'Bouche de Bétizac'</b> <sup>1</sup>	CS	0	0
<b>'Mariogoule'</b>	CS	21	0
<b>'Bournette'</b>	CS	2	3
<b>'Maraval'</b>	CS	3	4
<b>'Précoce Migoule'</b>	CS	4	12
<b>'Marsol'</b>	CS	1	2
<b>'Chevanceaux'</b>	S	0	1
<b>Gay_Atypique_1</b>	S	0	1
<b>'Goujaunac'</b>	S	1	2
<b>'Camberoune'</b>	S	0	2
<b>'Merle'</b>	S	0	3
<b>'Montagne'</b>	S	0	4
<b>'Portaloune'</b>	S	0	1
<b>'Précoce Ronde des Vans'</b>	S	0	1
# ID		33	36
4# Inconnus		10	13
Total		43	49

<sup>1</sup> En gras : variétés du verger

## Détermination des châtaigniers européens parmi les donneurs de pollen anonymes

Avant de chercher à déterminer l'espèce des donneurs de pollen anonymes à partir de l'analyse génétique des fruits, nous avons vérifié comment fonctionnait l'affectation pour les fruits dont le père avait été identifié par les analyses de paternité.

Sur les 261 châtaignes dont le père a été identifié avec CERVUS, 169 sont des F2, c'est-à-dire issus d'un croisement CS×CS, et 63 sont des backcross avec un châtaignier européen, c'est-à-dire issus d'un croisement CS×S. Les autres sont issus de divers croisements en plus faible nombre (par exemple, seulement 7 sont issus d'un backcross avec un châtaignier chinois et 4 avec un châtaignier japonais).

Les F2 (CS×CS) n'ont pas en moyenne une composition génétique équilibrée avec 50 % d'affectation à *C. crenata* et 50 % à *C. sativa*, comme attendu : ils sont en fait affectés à 57 % à *C. crenata* et à 43 % à *C. sativa* (figure 9). Cet écart aux proportions attendues est très significatif (test de Student,  $p < 10^{-15}$ ). De même, les backcross avec *C. sativa* ne sont pas 75 % *C. sativa* et 25 % *C. crenata* comme prévu mais 71 % *C. sativa* et 29 % *C. crenata* (figure 10). Les allèles du châtaignier japonais semblent là aussi favorisés (test de Student,  $p < 0,02$ ). Nous n'avons pas pu vérifier s'il y avait aussi un écart avec les proportions attendues

pour les backcross avec *C. crenata* du fait des effectifs limités (seulement quatre descendants de père *C. crenata*).

Tableau 5 : Pères identifiés par analyses de paternité des fruits de Bouche de Bétizac et Marigoule dans le verger E

Variété	Espèces	Bouche de Bétizac	Marigoule
'Bouche de Bétizac'	CS	0	6
'Marigoule'	CS	2	1
'Florifer'	CS	12	2
'Le Japonais'	CS	0	2
'Maraval'	CS	3	13
'Marlhac'	CS	3	0
'Marsol'	CS	1	14
'OB14'	CS	0	1
'Vignols'	CS	2	13
'La Villemorin'	C	0	4
'OG19'	MxCS	2	12
'300 ans'	S	1	0
'Bourrue de Juliac'	S	0	0
'Cota' (Ca 455)'	S	0	4
'Imperiale' (Ca 753)'	S	0	1
'Châtaigne du tailleur'	S	0	3
'Eminade '	S	1	0
'Le châtaignier'	S	3	5
'Montagne'	S	0	5
'Negrière'	S	2	4
'Sauvage Jacquard'	S	5	3
# ID		37	93
# Inconnus		58	75
Total		95	168

Pour les backcross CS×S, nous avons retenu le seuil minimum de 62,5 % d'appartenance au cluster *C. sativa*. Ce seuil est situé à mi-distance entre la valeur attendue pour les hybrides F1 ou F2 (50 %) et celle attendue pour les backcross avec *C. sativa* (75 %). Les analyses CERVUS indiquent que 24 % des châtaignes génotypées (63 sur 261) ont un père *C. sativa*. Avec le seuil de 62,5 %, on classe comme descendant d'un châtaignier européen 58 des 261 châtaignes génotypées, soit 22 % du total. Les résultats sont donc très proches de ceux obtenus avec CERVUS (22 % versus 24 %). En regardant de plus près les résultats, on a avec ce seuil 10 faux négatifs, c'est-à-dire que le père de la graine est bien un *C. sativa* selon l'analyse CERVUS mais le descendant est affecté à moins de 62,5 % au cluster *C. sativa*. De même, on trouve cinq faux positifs, c'est-à-dire que le père de la graine est un hybride européen/japonais, et non un châtaignier européen, selon l'analyse CERVUS, mais le descendant est affecté à plus de 62,5 % au cluster

*sativa*. Il y a au total 53 arbres (91 %) attribués à un père *C. sativa* à la fois avec l'analyse CERVUS et avec l'analyse STRUCTURE. Nous avons donc considéré qu'il était possible d'estimer avec une précision correcte la proportion de donneurs de pollen de l'espèce *C. sativa* avec l'analyse STRUCTURE et avons appliqué ce seuil aux graines de père inconnu. En revanche, il apparaît plus délicat d'appliquer ce type de procédure pour estimer les contributions des autres taxons.

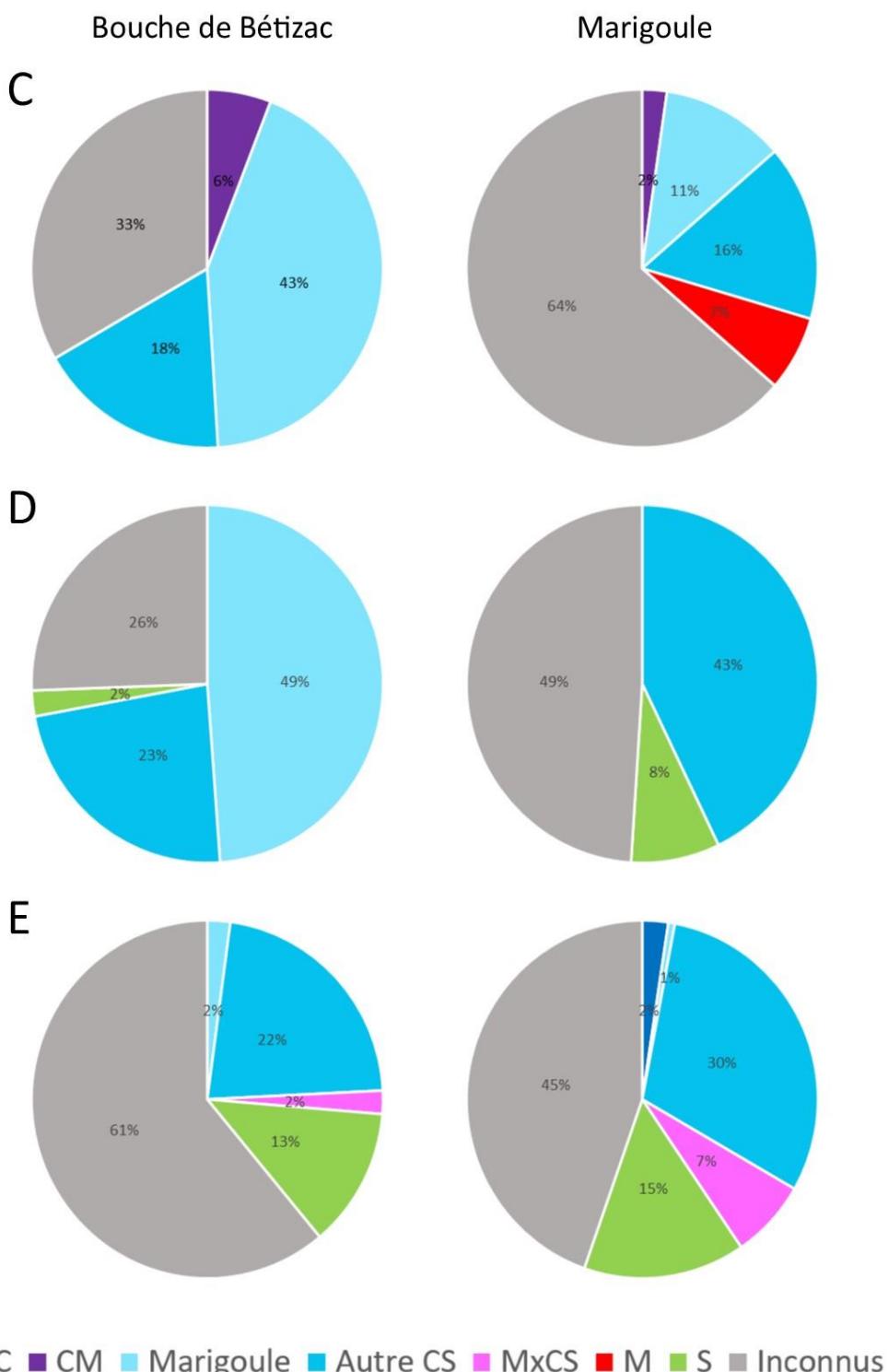


Figure 8 : Identification spécifique des fruits récoltés sur Bouche de Bétizac et Marigoule dans les trois vergers étudiés.

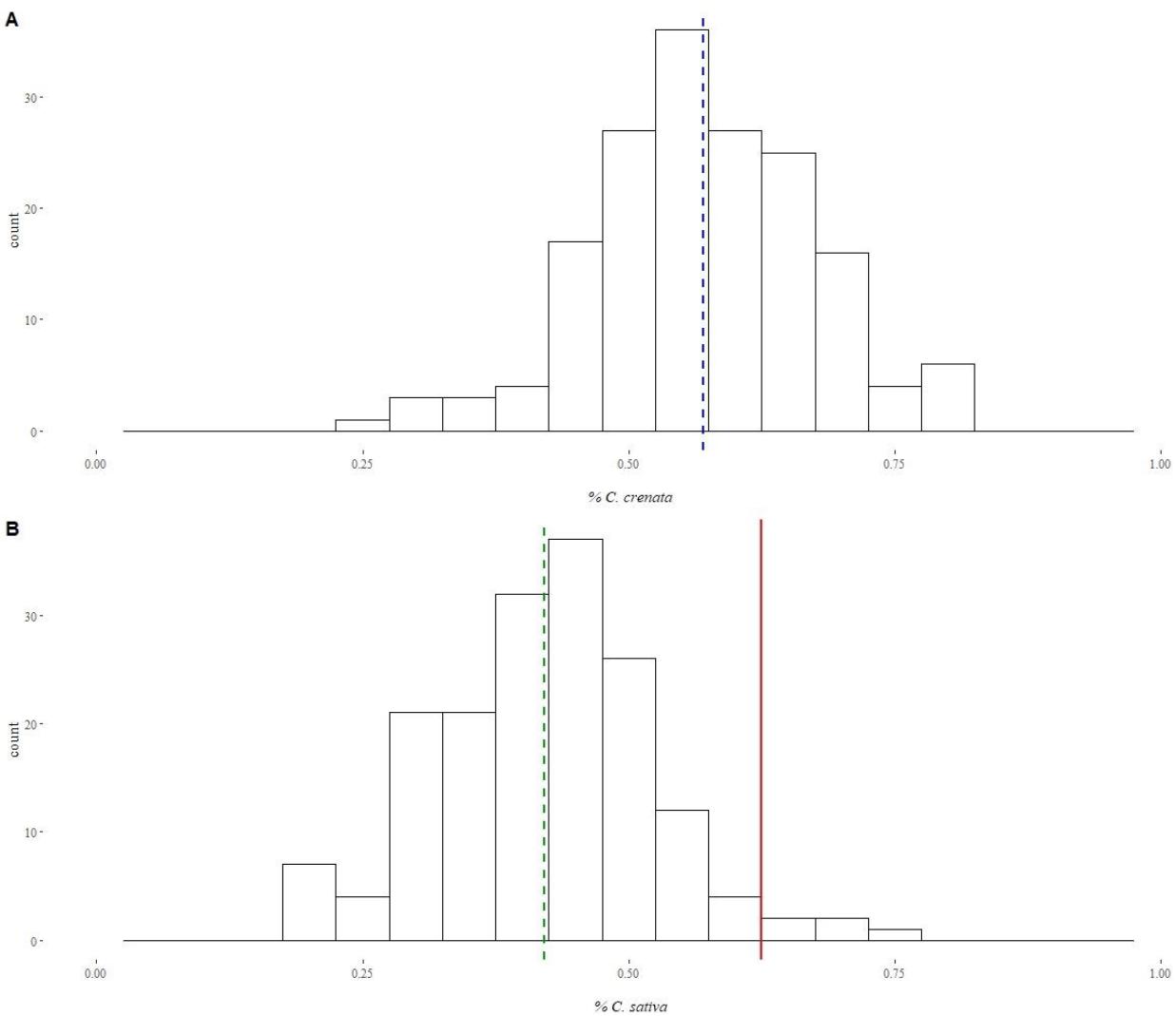


Figure 9: Comparaison des proportions de *C. crenata* (en haut) et *C. sativa* (en bas) chez les descendants F2. Le trait en pointillé représente la moyenne et le trait rouge le seuil de 62,5%.

Sur les 450 graines génotypées, il y avait 213 graines (47 %) dont les pères n'ont pas été identifiés dans le verger avec les seuils retenus (99 % ou 95 %). Cela signifie que l'assurance à la pollinisation fournie par les arbres extérieurs au verger est élevée. De plus, elle ne varie pas sensiblement en fonction de la variété de l'arbre-mère (46 % pour Bouche de Bétizac et 49 % pour Marigoule ; Tableau 6).

En appliquant la règle précédente (seuil de 62,5 % d'affectation au cluster *sativa*), on trouve que 40 % environ des graines sans père identifié (75/189) auraient été engendrées par un châtaignier européen. Si on prend l'ensemble des graines en compte, ces pères anonymes de châtaigniers européens pollinisent en moyenne 17 % des fruits, et cette assurance à la pollinisation varie peu suivant les variétés : elle est de 17 % pour 'Bouche de Bétizac' et 16 % pour 'Marigoule' (Tableau 6).

Tableau 6 : Proportion de fruits pollinisés par des arbres extérieurs au verger

Verger	Variété mère	# Fr géno <sup>1</sup>	Verger <sup>2</sup>	# Fr Père ID hors vergers <sup>3</sup>	# Fr père Non ID <sup>4</sup>	# Père S <sup>5</sup>	Hors verger <sup>6</sup>	Assur Ext <sup>7</sup>	dont assur Forêt <sup>8</sup>
C	Bétizac	51	34	3	14	4	17	33 %	8 %
C	Marigoule	44	16	9	19	10	28	64 %	23 %
D	Bétizac	43	32	1	10	6	11	26 %	14 %
D	Marigoule	49	25	11	13	8	24	49 %	16 %
E	Bétizac	95	37	0	58	22	58	61 %	23 % <sup>9</sup>
E	Marigoule	168	93	0	75	25	75	45 %	15 % <sup>9</sup>
<hr/>									
	Bétizac	189	103	4	82	32	86	46 %	17 %
	Marigoule	261	134	20	107	43	127	49 %	16 %
	Total	450	237	24	189	75	213	47 %	17 %

<sup>1</sup> Nombre de fruits génotypés

<sup>2</sup> Nombre de fruits pollinisés par les variétés plantées dans le verger

<sup>3</sup> Nombre de fruits pollinisés par des variétés connues plantées à l'extérieur du verger

<sup>4</sup> Nombre de fruits pollinisés par des arbres de l'extérieur du verger

<sup>5</sup> Nombre de fruits attribués à des pères *C. sativa* inconnus grâce aux analyses de paternité, vraisemblablement des châtaigniers forestiers (c'est-à-dire des génotypes de *C. sativa* n'appartenant à aucune variété connue)

<sup>6</sup> Nombre de fruits attribués aux variétés connues et aux arbres de l'extérieur du verger

<sup>7</sup> Pourcentage de fruits pollinisé par du pollen provenant de l'extérieur du verger

<sup>8</sup> Pourcentage de fruits pollinisés par des châtaigniers forestiers

<sup>9</sup> Pour le verger E, le pourcentage de fruits pollinisés par des châtaigniers forestiers n'est pas directement comparable avec celui trouvé pour les autres vergers car on n'a pas inclus de génotypes de référence

## DISCUSSION

Le principal résultat obtenu est simple : plus le nombre de donneurs de pollen présents dans le verger est important, plus le succès de la pollinisation augmente. Dans les vergers avec peu de donneurs de pollen, nous mettons ainsi en évidence un faible succès de la pollinisation illustrant une « *pollenizer limitation* ». Des différences propres aux deux variétés porteuses de fruits sont aussi apparentes : ainsi, dans les trois vergers, le taux de remplissage des bogues est meilleur chez ‘Bouche de Bétizac’, variété mâle-stérile, que chez ‘Marigoule’, variété mâle-fertile, confirmant les résultats du chapitre 3.

Les analyses de paternité effectuées ont permis d'obtenir un autre résultat majeur : les arbres de chaque verger étudié n'ont engendré en moyenne que la moitié (53 %) des fruits. Pour comparaison, dans le verger urbain isolé de Villenave d'Ornon étudié dans la section suivante (4.3.), les arbres du verger engendrent 99,4 % des fruits.

Les principaux handicaps des vergers de production pour la pollinisation sont le faible nombre de variétés donneuses de pollen et la nature des variétés utilisées. En effet, l'utilisation de variétés mâle-stériles

comme ‘Bouche de Bétizac’ n’apporte pratiquement aucun service de pollinisation aux autres variétés des vergers. Les arbres de cette variété, pourtant très abondants dans tous les vergers étudiés, n’ont en effet pollinisé que six fruits sur 261 (2 %) de la variété ‘Marigoule’. ‘Bouche de Bétizac’ est une variété décrite comme astaminée. Sa faible fécondité mâle était attendue. A contrario, les arbres de la variété ‘Marigoule’ ont pollinisé près de la moitié des fruits récoltés sur ‘Bouche de Bétizac’ dans les vergers C et D pauvres en donneur de pollen, mais moins de 1 % des fruits récoltés sur ‘Bouche de Bétizac’ du verger E, riche en donneurs de pollen. Cette plus forte fécondité mâle semble logique car ‘Marigoule’ est une variété longistaminée, mais les résultats obtenus à Douville (verger E) indiquent que cette variété n’est probablement pas idéale pour polliniser ‘Bouche de Bétizac’, peut-être pour des raisons de décalage phénologique entre variétés.

En conséquence, dans un verger composé de ces deux variétés, la quantité de pollen disponible pour chacune sera très inégale, car ‘Bouche de Bétizac’ ne peut pas polliniser ‘Marigoule’ alors que le contraire est possible. Dans ce cas-là, lorsque la variété étudiée a peu (ou pas) de donneurs de pollen compatibles, le nombre d’autofécondation, d’habitude très limité, peut augmenter. C’est peut-être ce qui s’est passé dans le verger C pour la variété ‘Marigoule’.

Nous n’avons pas identifié de « super polliniseurs », c’est-à-dire de variétés engendrant une majorité de fruits en de nombreuses occasions. Suivant les vergers, les variétés qui engendent le plus de fruits ne sont pas les mêmes, même si dans tous les cas, ce sont des variétés hybrides longistaminées. Une barrière aux croisements impliquant une mère hybride CS et un père S, de l’ordre de 0,4, a été décrite précédemment (section 4.3.). Les résultats des analyses de paternité confortent cette prédition car dans les vergers D et E, où il y a des donneurs de pollen hybrides et européens, la majorité des fruits récoltés sur ces deux variétés hybrides ont pour père un châtaignier hybride, les châtaigniers européens arrivant loin derrière.

Les analyses de paternité (CERVUS) et de structure des populations (STRUCTURE) fournissent des informations complémentaires. Les premières permettent d’identifier le génotype du père, mais pour un sous-ensemble de fruits seulement, puisque 42 % des fruits avaient un père inconnu. Au contraire, les analyses STRUCTURE peuvent apporter une information pour les fruits dont on n’a pas retrouvé le père. Toutefois, nous avons mis en évidence une difficulté non anticipée, qui semble liée à une distorsion de ségrégation favorisant les allèles de *C. crenata* aux dépens de ceux de *C. sativa*. Ce résultat mériterait d’être exploré plus en détail avec d’autres données, notamment celles obtenues à Villenave d’Ornon (section 4.3). Il faudrait aussi, pour aller plus loin, ajouter des génotypes de référence pour les espèces les moins représentées, en particulier *C. crenata*.

Cette apparente distorsion de ségrégation pourrait se révéler importante également pour la conservation des ressources génétiques de châtaignier. En effet, des châtaigniers japonais ou hybrides ont été introduits et massivement plantés en France et dans d'autres pays européens pour la culture de fruits. Il conviendrait donc à terme d'étudier les risques de contamination des châtaigniers européens autochtones par flux de gènes, d'autant que les châtaigniers asiatiques sont plus résistants aux maladies.

Malgré ces difficultés imprévues, nous avons pu repérer les fruits pollinisés par des châtaigniers européens anonymes, après avoir exclu les variétés de référence. Comme tous les arbres du verger ne sont pas caractérisés, on ne pouvait pas complètement exclure la présence cryptique d'autres variétés dans le verger, liées par exemple à des erreurs d'étiquetage. Nous avons donc, pour les vergers C et D, complété la liste des pères potentiels avec tous les génotypes de la collection de châtaignier INRAE. En conséquence, pour ces deux vergers, les fruits de pères *C. sativa* inconnus sont des arbres a priori extérieurs aux vergers et n'appartenant à aucune des principales variétés utilisées dans la région : le plus vraisemblable est qu'il s'agisse d'arbres forestiers ou d'arbres champêtres non greffés, c'est à dire issus de fruits. Au maximum, 17 % des fruits des vergers C et D ont été pollinisés par du pollen provenant de châtaigniers européens « sauvages ». Pour ces vergers de châtaigniers hybrides, le « service écosystémique » du paysage autour des vergers ne vient donc pas majoritairement des forêts et bois environnants de châtaigniers européens mais plutôt d'arbres hybrides, soit correspondant à des variétés greffées connues, soit à des arbres inconnus greffés ou non. Il serait toutefois important de confirmer ce résultat en augmentant la puissance des analyses, en particulier dans le verger E. Le service de pollinisation rendu par les forêts serait certainement plus élevé pour des vergers constitués de châtaigniers européens, vu l'absence de barrière interspécifique. Il faut noter que la pérennité de ce service de pollinisation n'est pas garantie car les châtaigniers forestiers et champêtres dépérissent fortement depuis plusieurs années. En conséquence, tous les vergers, mais tout particulièrement les vergers pauvres en donneurs de pollen, risquent de voir leur rendement diminuer si ces déperissements se poursuivent et que rien n'est fait pour augmenter la production de pollen compatible dans les vergers.

Ce travail démontre l'importance de la conception des vergers et du choix des variétés plantées. Sans un nombre suffisant de donneurs de pollen, la pollinisation croisée ne sera pas assurée et la production de fruits sera réduite. Une perspective serait de mettre au point un modèle spatialement explicite de pollinisation puis de tester par simulation différents types de vergers afin d'étudier les conséquences du nombre et de la répartition des donneurs de pollen sur la production de fruits.

## CONTRIBUTIONS

L'échantillonnage des arbres, la récolte des bogues et les mesures des taux de remplissage ont été réalisés par Clément Larue. La préparation des échantillons et l'extraction d'ADN ont été réalisées par Clément Larue. Le génotypage a été réalisé par la plateforme génomique et transcriptomique de Bordeaux (PGTB). Les analyses ont été réalisées par Clément Larue. La première version de l'article a été rédigée par Clément Larue.

## REFERENCES

- A. LA n° 02-15, 21 septembre 2015, portant homologation du cahier des charges du label rouge « Marron ».
- Breisch H (1995) Châtaignes et Marrons. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, Paris, France
- Carisio L, Díaz SS, Ponso S, et al (2020) Effects of pollinizer density and apple tree position on pollination efficiency in cv. Gala. Sci Hortic 273:109629. <https://doi.org/10.1016/j.scientia.2020.109629>
- Eurocastanea, AREFLH (2019) Livre blanc de la châtaigne en Europe
- Fernández-López J, Fernández-Cruz J, Míguez-Soto B (2021) The demographic history of *Castanea sativa* Mill. in southwest Europe: A natural population structure modified by translocations. Mol Ecol 30:3930–3947. <https://doi.org/10.1111/mec.16013>
- Food and Agriculture of the United Nations (2020) FAOSTAT Statistical Database. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed 9 Oct 2020
- Gonthier P, Robin C (2019) Diseases. In: The chestnut handbook: crop and forest management. CRC Press
- Kron P, Husband BC (2006) The effects of pollen diversity on plant reproduction: insights from apple. Sex Plant Reprod 19:125–131. <https://doi.org/10.1007/s00497-006-0028-2>
- Larue C, Austruy E, Basset G, Petit RJ (2021a) Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea* spp.): an integrated approach. Bot Lett 168:348–372. <https://doi.org/10.1080/23818107.2021.1872041>
- Larue C, Guichoux E, Laurent B, et al (2021b) Development of highly validated SNP markers for genetic analyses of chestnut species. Conserv Genet Resour. <https://doi.org/10.1007/s12686-021-01220-9>
- Mookerjee S, Guerin J, Collins G, et al (2005) Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove. Theor Appl Genet 111:1174–1182. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0049-5>
- Nishio S, Takada N, Terakami S, et al (2021) Genetic structure analysis of cultivated and wild chestnut populations reveals gene flow from cultivars to natural stands. Sci Rep 11:240. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80696-1>
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. Bioinformatics 28:2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pitte J-R (1986) Terres de Castanide : Hommes et paysages du Châtaignier de l'Antiquité à nos jours. Fayard
- Wilcock CC, Neiland MRM (2002) Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. Trends Plant Sci 7:270–277. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02258-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02258-6)
- Xiong H, Zou F, Guo S, et al (2019) Self-sterility may be due to prezygotic late-acting self-incompatibility and early-acting inbreeding depression in Chinese chestnut. J Am Soc Hortic Sci 144:172–181. <https://doi.org/10.21273/JASHS04634-18>

# Coupling pollen pool and fruit set models reveals sexual interference in chestnut

Clément Larue<sup>a,b</sup>, Etienne K. Klein<sup>c</sup>, Rémy J. Petit<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univ. Bordeaux, INRAE, BIOGECO, 33610 Cestas, France

<sup>b</sup>INVENIO, Maison Jeannette, 24140 Douville, France

<sup>c</sup>INRAE, BioSP, 84000 Avignon, France

## INTRODUCTION

Pollination is the critical phase during which pollen is released from an anther and transported to the stigma of a compatible individual plant. It allows distant individual plants to mate with each other and reproduce despite their sessile nature. As most flowering plants depend on mobile animal agents for their pollination (Ollerton et al. 2011; Rodger et al. 2021), this makes their reproduction highly vulnerable to pollinators decline, resulting in worldwide concerns (Reilly et al. 2020; Dicks et al. 2021). Better linking pollination with fruit set in nature and under cultivation is therefore essential for informed evaluation of the incurred risks. It will help integrate pollination and mating systems studies, two research fields that have long developed in relative isolation due to the separate development of ecological and genetic perspectives in evolutionary biology (Harder and Barrett 1996).

A major achievement for mating system studies during the last 30 years has been the development of spatially explicit mixed-mating models informed by powerful DNA-based marker data. These allow analyses of male mating success that account for spatial processes. The models have been considerably improved since the first publications on the topic (Schoen and Stewart 1986; Adams and Birkes 1991; Adams et al. 1992). They are now used to identify intrinsic and extrinsic factors influencing male fecundity (Roeder et al. 1989; Burczyk et al. 1996; Klein et al. 2008; Tani et al. 2009; Lagache et al. 2014; Chybicki et al. 2021). They can clarify how far pollen travels, which travel path is used by pollinators, and which pairs of individuals can mate, depending on their flowering phenology and other factors (Burczyk and Prat 1997; Oddou-Muratorio et al. 2005; Klein et al. 2008; Lander et al. 2013). A recent trend is to consider the whole interindividual variance of male fecundity (Klein et al. 2008) and individual variation in parameters such as selfing or immigration rates (Gaüzère et al. 2013; Chybicki et al. 2021). They have also been extended to accommodate the gametophytic self-incompatibility locus (Stoeckel et al. 2012) as well as hybridization (Klein et al. 2017), allowing field-based estimates of interspecific mating barriers (Lagache et al. 2013). Finally, the models have been adapted to the study of successive generations of plants, allowing both pollen and seed dispersal as well as male and female reproductive success to be

investigated simultaneously (Oddou-Muratorio and Klein 2008; Oddou-Muratorio et al. 2010, 2018; Bontemps et al. 2013; Chybicki and Oleksa 2018). However, they still fall short of providing a complete predictive tool to study pollination and its consequences on seed or fruit set, a primary concern in pollination science. Indeed, they are rooted in the genetic analysis of extant seeds or seedlings, ignoring failed reproduction events.

When investigating female mating success, the focus is on the proportion of flowers that do not develop into seeds because of pollen limitation (Stephenson 1981; Burd 1994; Larson and Barrett 2000). Indeed, there can be insufficient pollinators, limitation in pollinator visits, inefficient pollen transfer, low pollen-tube survival or zygote death (Wilcock and Neiland 2002; Harder and Aizen 2010). Just as for male fecundity, female mating success can depend on a range of intrinsic and extrinsic factors, including the ability of individual plants to attract pollinators (Totland and Sottocornola 2001; Hegland and Totland 2008; Mitchell et al. 2009). At first sight, studying female mating success seems more straightforward and accessible than investigating male fecundity, as the proportion of empty and filled seeds can be directly counted with no need for heritable markers (Bernasconi 2003). However, the information acquired on female mating success by measuring fruit set or seed set and comparing the results with the spatial distribution of potential pollen donors is very limited, in the absence of a precise mechanism linking female pollination success with the pollen pool (Platt et al. 1974; Silander 1978; Knapp et al. 2001; Ahee et al. 2014). An alternative but tedious and sometimes unrealistic approach is to rely on pollen addition experiments (Waser and Price 1989). Another solution would be to couple marker-based male fecundity and pollen dispersal studies with seed set studies, thereby integrating genetic and ecological data. This should allow major breakthroughs in pollination science by simultaneously exploring pollen emission, transport and reception in a single study. For instance, an increase in paternity-pool size may be accompanied by higher seed sets, as speculated by Levin (1988). Here, we develop for the first time such a complete pollination model, by coupling a spatially explicit mating model based on paternity analyses with a seed set model, using chestnuts as case study.

Chestnut (genus *Castanea*, Fagaceae), an insect-pollinated tree cultivated for its fruits (Larue et al. 2021a), appears to be a suitable study model for such work. Earlier studies have shown that it is largely self-incompatible (Xiong et al. 2019), so it should be sensitive to pollen limitation. In this tree, fruit set can be assessed effectively and rapidly (section 3.3.). By focusing on an isolated population that was exhaustively sampled (Larue et al. 2021b), most genotyped seeds could be sourced to their corresponding pollen donor with modern genotyping techniques (Larue et al. 2021d), resulting in detailed quantitative and qualitative description of the pollen pool sampled by each mother tree.

In chestnut, a mass-flowering tree species, huge pollen production (Larue et al. 2021a), large tree size and limited movements of some of the pollinators (personal observations) result in high levels of self-pollination, as demonstrated experimentally using single pollen grain genotyping experiments (Hasegawa et al. 2009). In this tree genus, the species are characterized by a late-acting mode of self-incompatibility, implying that when self-pollen is rejected, the ovules can be lost for reproduction (Seavey and Bawa 1986; Xiong et al. 2019). This combination of high rates of self-pollination and late-acting self-incompatibility should lead to high rates of ovule discounting and reduced fruit set, a case of self-interference. The existence of self-interference, an outcome of sexual selection (Barrett 2002), has been demonstrated experimentally in chestnut using mechanical and chemical emasculation of cosexual trees, resulting in greatly increased fruit set (section 3.5.; Zongyun and Kuiying 2009). Hence, correctly modelling not only the amount but also the quality of the incoming pollen pool arriving on the stigmas of mother trees will be critical to predict correctly the fate of ovules and eventually fruit set. This should lead to a greater understanding of the consequence of pollination on fruit production, by furthering our understanding of the demographic determinant of evolution in natural populations and of fruit production in agriculture.

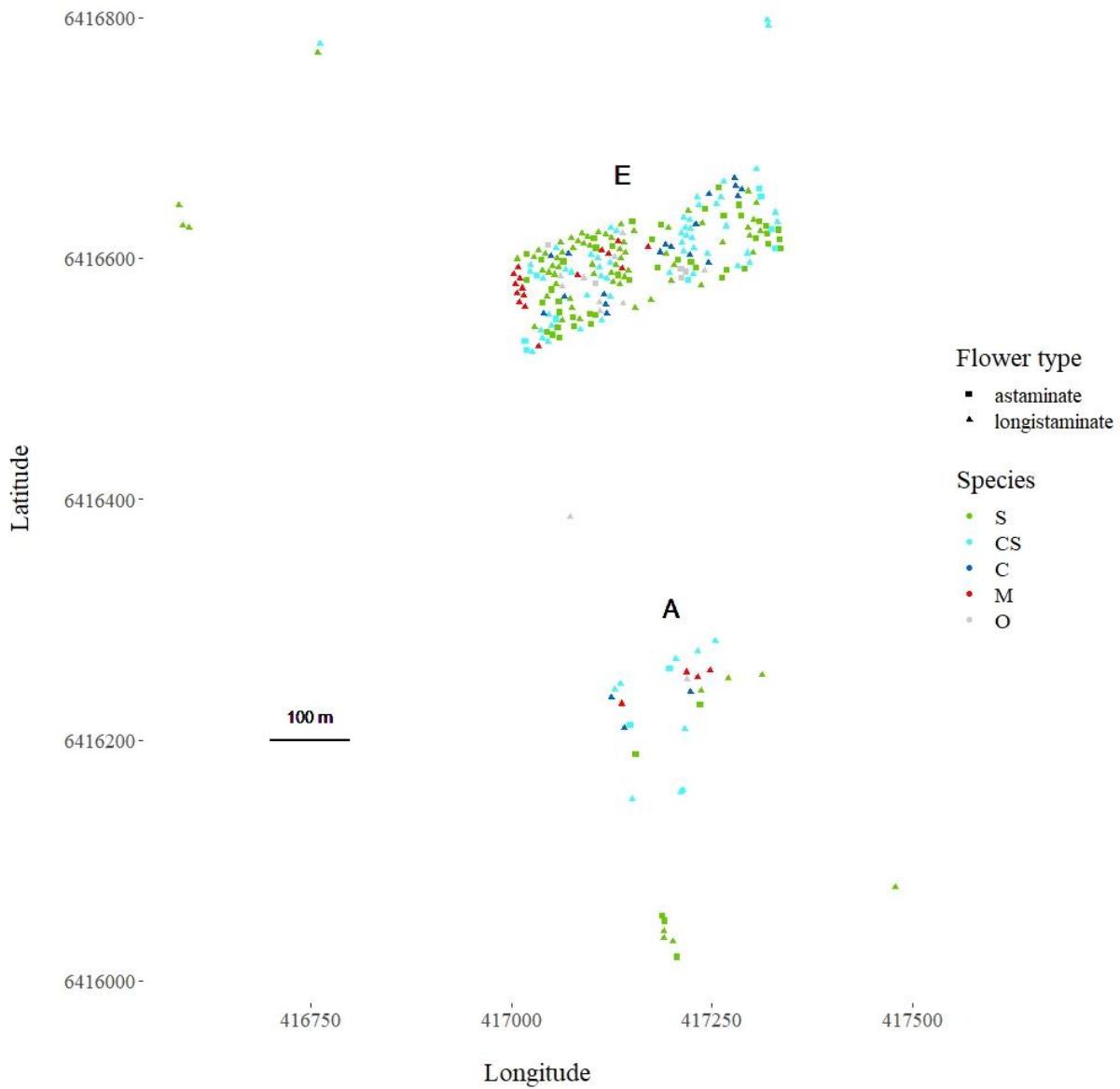
In this study, we couple a mating model with a fruit set model. We collect a large dataset of mating events and fruit set measures in a multi-species chestnut orchard and use a process-based model to disentangle the different mechanisms determining the composition of pollen pools and the success of fertilisation and fruit development. We then compare parameter estimates (pollen dispersal kernel, phenology, species barriers, selfing rate, embryo abortion rates...) with available information on the biology of the species. In particular, we evaluate the hypothesis that self-pollination reduces fruit set in chestnut because of ovule discounting.

## MATERIALS AND METHODS

### Study site

The 275 studied trees are located in Villenave d'Ornon, near Bordeaux, in southwestern France (44.788319 N, -0.577062 E). The study site has been described previously (Larue et al. 2021b). Most trees (244) belong to the INRAE chestnut germplasm collection, which is located in two nearby orchards. They belong to three chestnut species and their hybrids: the European chestnut (*Castanea sativa*), the Japanese chestnut (*C. crenata*) and the Chinese chestnut (*C. mollissima*). The first orchard, called “A plot”, was planted in 1970 and comprises 29 widely spaced large trees on 2.3 ha. The second orchard, called “E plot”, was planted in 1990 and comprises 215 more closely spaced trees on 3.5 ha. All the 244 trees are grafted on two rootstocks: ‘Marsol’ (CA07) and ‘Maraval’ (CA74), two hybrids of *C. sativa* and *C. crenata*.

We also identified 24 small but already fertile trees in the nursery and 7 adult trees outside of the INRAE campus but located within a distance of one kilometre from the two orchards. All trees were geolocated using a Garmin 64st gps and their coordinates are expressed in lambert 93 (Figure 1). Tree positions were verified and corrected using QGIS Software (Qgis Desktop 3.16.4) and satellite photos from IGN BdOrtho.



*Figure 1: Map of all trees from the INRAE chestnut collection and from chestnut trees growing in the vicinity used in this study. Shape of symbols indicates the type of male flowers, whereas its colour indicates the species.*

### Monitoring of flowering phenology

To study temporal compatibility between trees, we described in detail the flowering phenology of each tree using a scale specifically developed for chestnuts (Larue et al. 2021c). We scored phenology during

the late spring of 2018, twice a week during six weeks, between June and mid-July. During each monitoring session, each tree received three scores: one for male flowers of unisexual male catkins (PhM), another for female inflorescences of bisexual catkins (PhF) and a last one for male flowers of bisexual catkins, which was finally removed from the analyses (Larue et al. 2021b).

### Phenotype characterization

To study the consequences of the phenotype on the pollination success, we precisely described the architecture and the capacity of each tree to produce pollen in spring 2018 (Larue et al. 2021b). After examining the flowers of each tree (i.e., number and length of stamens and length of stamen filaments), we assigned it to one of four flower type categories: astaminate, brachystaminate, mesostaminate and longistaminate (Solignat and Chapa 1975). For subsequent analyses, we defined the *FType* covariate by pooling the brachystaminate trees with the astaminate ones (subsequently called the astaminate category) and the mesostaminate trees with the longistaminate ones (subsequently called the longistaminate category). We measured canopy average diameter of each tree (in metre) and calculated the canopy area (*CA* covariate, measured in square meters) by assuming that the canopy had the shape of a half-sphere, and visually estimating the proportion of missing canopy. Finally, we measured the average length of the male catkins of each tree (the *FLength* covariate, measured in centimetres). In the cases where phenotypic data was missing, it was replaced by the mean value of the corresponding variable.

### Fruit set estimation

In chestnuts, female inflorescences are composed of three female flowers located side by side. Each flower, if pollinated, produces a nut protected by the pericarp. If pollination fails, the pericarp is still present because of its maternal origin, but remains empty. During fall 2018 and 2019 we attempted to collect at least 20 and 30 burrs in the canopy of each tree or on the ground underneath the canopy, and we estimated fruit set by counting the number of developed and aborted fruits per burr, excluding burrs with only aborted fruits. Fruit sets were positively correlated across years ( $r=0.62$ ,  $n=160$ ), so fruit set data were considered as independent replications of the same pollination process (see below for the definition of *Lfructi* likelihood).

### Chestnut germplasm collection

All trees from the collection had been genetically characterised previously using SNP markers (Larue et al. 2021b). Briefly, in May 2018, we collected one or two young leaves from all trees. We isolated DNA from 50 mg of leaves using a custom-made CTAB protocol with 1.4M NaCl lysis buffer (Larue et al. 2021d). Two trees died between their georeferencing and their sampling, so we isolated DNA from 273 chestnut trees. Each tree was assigned to a species, as explained in Larue et al. (2021d). We identified 121

*C. sativa*, 94 *C. sativa* × *C. crenata* hybrids, 21 *C. crenata*, 20 *C. mollissima*, and 17 other interspecific crosses subsequently pooled in the analyses (2 *C. crenata* × *C. mollissima* hybrids, 10 *C. sativa* × *C. mollissima* hybrids and 5 three-ways hybrids) (Table 1).

Table 1: Composition of the studied plot: chestnut tree sample sizes by species and flower type, expressed in number of clones (grafted varieties) and ramets (trees)

Species	<i>Sativa</i>		hybrids		<i>crenata</i>		<i>mollissima</i>		others		total / flower type		All
Flower type	L <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	L	A	L	A	L	A	L	A	L	A	
# clones	28	17	32	3	7	0	17	0	6	3	90	23	113
# ramets	71	50	86	8	21	0	20	0	12	5	210	63	273
# clones (%)	0.25	0.15	0.28	0.03	0.06	0.00	0.15	0.00	0.05	0.03	0.80	0.20	1
# ramets (%)	0.26	0.18	0.32	0.03	0.08	0.00	0.07	0.00	0.04	0.02	0.77	0.23	1

<sup>1</sup> L: mesostamine and longistamine trees.

<sup>2</sup> A: astamine and brachystamine trees.

## Nut sampling and DNA isolation

To perform paternity analysis, we collected at least 40 burrs and up to 95 on 43 mother trees in September 2018 (Table 2). For each burr, we isolated DNA either from one randomly selected nut or from all three nuts. The 43 mother trees belong to the three chestnut species and to one category of hybrids, the most frequent one (*C. sativa* × *C. crenata*). All samples were stored at -20°C until DNA isolation. We isolated DNA from 50 mg of chestnut using CTAB custom DNA isolation protocol for 96 well plate format with 2.4M NaCl lysis buffer (Larue et al. 2021d). We checked the quality of isolated DNA with a spectrophotometer Thermo Scientific NanoDrop 8000.

## SNP genotyping

We characterized chestnuts at 79 SNP using Agena MassARRAY Platform (Larue et al. 2021d) and checked the raw data using MassARRAY Typer Analyzer 4.0.26.75 (Agena Biosciences). We excluded loci with weak or ambiguous signal (i.e., unclear cluster delimitation) and retained 68 SNP to perform the subsequent analyses.

## Categorical paternity analysis

A categorical paternity analysis was performed with the software CERVUS (Kalinowski et al. 2007). We calculated allelic frequencies using the 113 unique genotypes of all adult trees constituting the INRAE chestnut germplasm collection. Parameters for genotypes simulation of offspring used with CERVUS are listed in Supplementary 1; self-fertilisation was enabled. We calculated confidence intervals using LOD and delta LOD with a relaxed level of 95% and a strict level of 99%.

## Statistical analyses

In exploring the results, the significance of the relationships between variables was tested with a linear model and the differences in male fertility between flower types and among species were tested with an ANOVA. Scatter plots and interspecific barriers plots were drawn with basic functions implemented in R (R Core Team 2013), while boxplots and histograms were drawn with `ggplot()`, `ggthemes()` and `cowplot()` packages.

In an attempt to check model assumptions on pollen production and mating system, we measured both female and male selfing rates in astamine and longistamine trees. We used Fisher's exact tests to test for differences between them. Male selfing rate is rarely used in mating system studies. It was defined by Harder and Wilson (1998) as the fraction of a plant's siring contributions derived through selfing. For meaningful interpretation, it requires a representative sample of seeds (Matsuo et al. 2014). Here we focused on a population-level analysis, by relying on seeds mothered and sired by astamine and longistamine trees, considering that the corresponding sample of seeds is broadly representative of the overall population.

## Modelling and parameter estimation

### Spatially-explicit mating model

We used a spatially explicit individual-based mating model to investigate intra- and interspecific mating events with pollen from inside and outside the studied stand. This allows a simultaneous estimation of all the parameters influencing male fecundity and pollen dispersal using a Bayesian approach for random effect mating model (Klein et al. 2008; Klein and Oddou-Muratorio 2011; Chybicki et al. 2019).

Several components have been specifically added to consider the present dataset and the present questions investigated here: (i) coupling the standard likelihood of pollen pool composition with the likelihood of fruit set; (ii) considering several species with fertilisation barriers between each; (iii) modelling the effect of male and female flowering dates on mating probabilities; (iv) including a clone-ramet information with self-incompatibility among ramets of the same clone - both prezygotic and postzygotic SI were modelled; and (iv) two models were written for the fruit set likelihood, including either postzygotic abortion only or postzygotic abortion together with pollen limitation. In both models we investigated the effects of covariates on fruit set. We also accounted for mistyping at a maximum of two loci per genotype (using a mistyping rate of 0.001 at all loci), and for the presence of null alleles at 12 of the 68 loci (identified when checking for Mendelian segregation in mother trees) when computing the likelihoods of genotypes.

### Likelihoods

More specifically, the full likelihood of the data writes:

$$L(\text{data}|\text{parameters}) = L_{\text{genet}} \times L_{\text{fructi}} \quad \text{Eq (1)}$$

$$L_{\text{genet}}(\text{data}|\text{parameters}) = \prod_{o:\text{genotyped seeds}} P(g_o|g_{j_o})$$

where  $g_o$  is the genotype of a seed and  $g_{j_o}$  is the genotype of its mother-tree  $j_o$ .

$$L_{\text{fructi}}(\text{data}|\text{parameters}) = \prod_{b:\text{burrs}} P(n_b|j_b)$$

where  $n_b$  is the number of formed nuts in the burr  $b$  sampled on the mother-tree  $j_b$ . Note that for each mother tree all the burrs from 2018 and 2019 were treated as independent repetitions.

For the first component of Eq (1), the probability that a seed  $o$  from mother  $g_{j_o}$  has genotype  $g_o$  is:

$$P(g_o|g_{j_o}) = \text{mig} \times T(g_o|g_{j_o}, AF) + (1 - \text{mig}) \times \sum_{k:\text{candidates}} \pi_{j_0 k} \times T(g_o|g_{j_o}, g_k) \quad \text{Eq (2)}$$

where  $T(g_o|.,.)$  are the Mendelian probabilities of generating the offspring's genotype  $g_o$  from the known genotypes of the two parents;  $AF$  are the SNP allelic frequencies in the external population,  $\text{mig}$  corresponds to the pollen migration rate from outside the site; and  $\pi_{jk}$  is the relative contribution of the candidate father  $k$  to the pollen pool of mother  $j$  (detailed below).

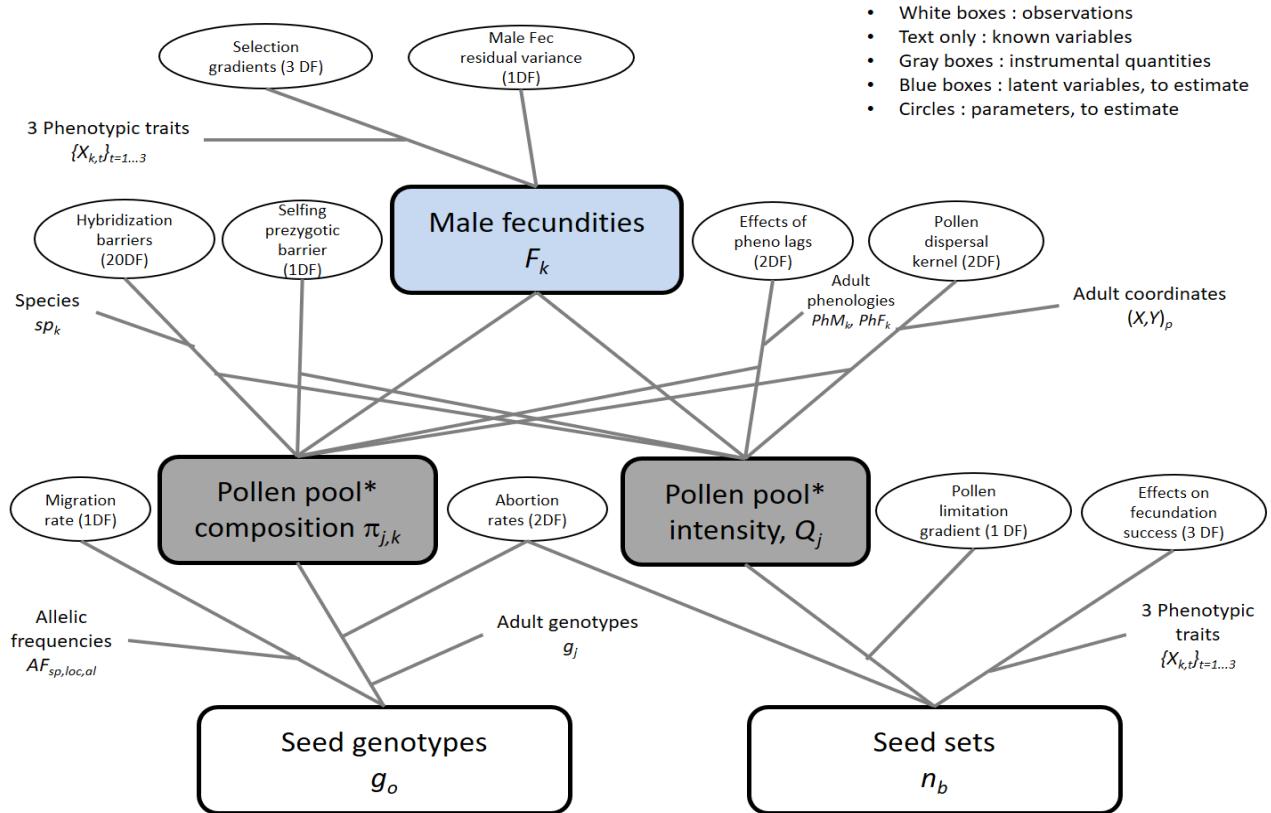
For the second component of Eq (1), the probability that a burr  $b$  from a mother  $j_b$  has  $n_b$  formed nuts is:

$$P(n_b = 1|j_b) = \frac{3\alpha_{j_b}(1-\alpha_{j_b})^2}{1-(1-\alpha_{j_b})^3} \quad \text{Eq (3)}$$

$$P(n_b = 2|j_b) = \frac{3\alpha_{j_b}^2(1-\alpha_{j_b})}{1-(1-\alpha_{j_b})^3} \quad \text{Eq (4)}$$

$$P(n_b = 3|j_b) = \frac{3\alpha_{j_b}^3}{1-(1-\alpha_{j_b})^3} \quad \text{Eq (5)}$$

where  $\alpha_{jb}$  is the probability for a single nut to be formed, i.e. fertilization occurs and no abortion occurs (see below). These equations are obtained assuming that (i) the different nuts in the same burr are independent of each other (given the amount and composition of pollen received) and (ii) burrs with zero nut cannot be observed. Different parameterized models for  $\alpha_{jb}$  were built to account for different processes (see below). Figure 2 shows how observations, latent variables and parameters interact in the Directed Acyclic Graph of this hierarchical model.



\* « Pollen pool » here is considered after fecundation but before abortion, i.e. after prezygotic barriers but before postzygotic barriers

Figure 2: Directed acyclic graph illustrating the main model used

### Modelling the relative contributions of the candidate fathers to the pollen pools ( $\pi_{jk}$ )

Central in Eq (2), the relative contribution  $\pi_{jk}$  of the candidate father  $k$  to the pollen pool of mother  $j$  results from the competition with pollen from all other known candidate fathers. Following Smouse and Sork (2004), we considered three kinds of factors determining the pollen pool available to each mother-tree  $j$ : factors affecting the male fecundity of each father tree  $k$  of the stand ( $F_k$ ); factors affecting the dispersal from location of mother  $j$  to the location of father  $k$  ( $DISP_{jk}$ ); factors affecting the compatibility

between mother  $j$  and father  $k$  ( $COMPAT_{jk}$ ) (including phenology, species barriers, self-incompatibility between ramets of the same clone):

$$\pi_{jk} = \frac{F_k \times DISP_{jk} \times COMPAT_{jk}}{\sum_l F_l \times DISP_{jl} \times COMPAT_{jl}} \quad \text{Eq (6)}$$

$$F_k = \exp(v_1 FTtype_k + v_2 CA_k + v_3 FLength_k + E_k) \quad \text{Eq (7)}$$

where  $v_1$ ,  $v_2$  and  $v_3$  are the fixed effects of the three covariates of interest (flower-type (Asta=0; Longi=1), canopy area, catkin length) and  $E_k$  is an individual random effect of variance  $V_E$ .

$$DISP_{jk} = \frac{s}{2\pi a \Gamma(2/s)} \exp\left(-\frac{d_{jk}^s}{a^s}\right) \quad \text{Eq (8)}$$

where  $s$  is the shape parameter and  $a$  is a parameter related to the mean dispersal distance  $\delta$  following  $\delta = a \frac{\Gamma(3/s)}{\Gamma(2/s)}$ . The parameters  $s$  and  $\delta$  were estimated. Note that for selfing, i.e. for  $j=k$  and  $d_{jj}=0$ , we used the integral of the exponential power kernel over a disk of radius 3 m mimicking the canopy of an average tree:

$$DISP_{jj} = \int_{r=0}^{r=3} \frac{sr}{a \Gamma(2/s)} \exp\left(-\frac{r^s}{a^s}\right).$$

$$COMPAT_{jk} = SI_{jk} \times h_{sp_j, sp_k} \times e^{-\frac{(PhM_k - PhF_j - \Delta_{opt1})^2}{\sigma_1^2}} \quad \text{Eq (9)}$$

where  $SI_{jk} = b_{SI}$  if  $j$  and  $k$  belong to the same clone of the same species and  $SI_{jk} = 1$  if  $j$  and  $k$  belong to different species or different clones of the same species. In this equation  $SI_{jk}$  represents a prezygotic self-incompatibility (SI) barrier: i.e. a pollen grain has a chance to win the race for fertilisation weighted by a factor  $SI_{jk}$  ( $b_{SI}$  is expected <1). In model 1 below, we also consider a postzygotic SI barrier, with selfed embryos characterized by different abortion rates than outcrossed ones between fertilisation and seed maturity. Model 2 is identical to model 1 except for the addition of a mechanism for pollen limitation as a determinant of fruit set.

In Eq (9)  $h_{sp_j, sp_k}$  represents the relative fertilisation success on a mother  $j$  of species  $sp_j$  of each pollen grain from a father  $k$  of species  $sp_k$ , relatively to a compatible pollen of species  $sp_j$  (thus any  $h_{sp, sp} = 1$ ). Finally,  $PhM_k$  and  $PhF_j$  are the phenological indices for male blooming and female receptivity.

Parameters  $b_{SI}$ ,  $h$ 's,  $\Delta_{opt1}$ ,  $\sigma_1$  are to estimate.

### Modelling the probability of a filled nut ( $\alpha_j$ )

Central in Eq (3-5), the probabilities of a filled nut,  $\alpha_j$ , for all mothers  $j$ , were modelled in two different ways described below.

**Model 1:** seed-set determined by differential abortion rates:

$$\alpha_j = \frac{\exp(i+w_2CA_j+w_3FLength_j)}{1+\exp(i+w_2CA_j+w_3FLength_j)} \sum_k \pi_{jk} \alpha_{jk} \quad \text{Eq (10)}$$

where  $\pi_{jk}$  writes as above and corresponds to the probability of fertilisation by father  $k$ , and  $\alpha_{jk}$  is the survival rate at nut stage of an ovule fecundated by father  $k$ . Here SI was the only determinant of abortion with  $\alpha_{jk} = \alpha_{SI}$  if  $j$  and  $k$  belong to the same clone and  $\alpha_{jk} = 1$  if  $j$  and  $k$  belong to different clones. Parameters  $w_2$  and  $w_3$  are the effects of covariates on fertilisation success and  $i$  is the intercept. Here the left component of  $\alpha_j$  is a logit link that expresses the probability of fertilisation success (between 0 and 1) as a function of the covariates and the right component expresses the probability that the embryo turns into a nut without abortion.

In that model, the proportion of father  $k$  in the non-aborted nuts turns into

$$\pi'_{jk} = \frac{\pi_{jk} \times \alpha_{jk}}{\sum_l \pi_{jl} \times \alpha_{jl}}$$

(i.e.  $\pi_{jk}$  is thus replaced by  $\pi'_{jk}$  in Eq (2) of  $L_{genet}$ ).

**Model 2:** fruit set determined by differential abortion rates and pollen limitation:

$$\alpha_j = \frac{\exp(i+w_2CA_j+w_3FLength_j+w_{PL}Q_j)}{1+\exp(i+w_2CA_j+w_3FLength_j+w_{PL}Q_j)} \sum_k \pi_{jk} \alpha_{jk} \quad \text{Eq (11)}$$

where  $\pi_{jk}$ ,  $\alpha_{jk}$ ,  $w_2$ ,  $w_3$  and  $i$  are defined as above and where

$$Q_j = \sum_{l: \text{father trees}} F_l \times DISP_{jl} \times COMPAT_{jl}$$

is the total amount of effective pollen received by the mother-tree  $j$ . Here “effective” means “after the prezygotic barriers”. The parameter  $w_{PL}$  thus measures the importance of pollen limitation as a determinant of seed set.

Here again, the proportion of father  $k$  in the non-aborted nuts, used in Eq (2), is replaced by

$$\pi'_{jk} = \frac{\pi_{jk} \times \alpha_{jk}}{\sum_l \pi_{jl} \times \alpha_{jl}}$$

### Estimation procedure

We used a Bayesian framework and a Monte-Carlo Markov Chain (MCMC) with a Metropolis-Hastings algorithm to estimate jointly all latent variables, the  $E_k$ 's random components of fecundity, and all parameters,  $mig$ ,  $\delta$ ,  $s$ ,  $v_1$ ,  $v_2$ ,  $v_3$ ,  $h$ 's,  $\Delta_{opt1}$ ,  $\sigma_1$ ,  $b_{SI}$ ,  $a_{SI}$ ,  $w_2$ ,  $w_3$ ,  $w_{PL}$ .

Each MCMC was run for 1 000 000 iterations and the first 250 000 were discarded. We visually checked the good convergence of the chains towards a stationary state and ran several independent chains to check that all reached the same stationary state. We kept one iteration every 50 to compute posterior distributions and posterior means for the parameters, the individual fecundities, and some additional variables enabling to evaluate the goodness-of-fit of the models.

## RESULTS

There are 273 mature trees in the study plot. Their canopy area ( $CA$ ) and catkin length ( $FLength$ ) were highly variable:  $CA = 20.9 \text{ m}^2$  (0.04-224) and  $FLength = 18.7 \text{ cm}$  (9.4-35.2). Using genetic analyses, we identified 121 *C. sativa* belonging to 45 clones, 94 *C. sativa*  $\times$  *C. crenata* hybrids (35 clones), 21 *C. crenata* (7 clones), 20 *C. mollissima* (17 clones) and 17 other interspecific hybrids (9 clones) (Larue et al. 2021b). Among these trees, there were 63 astamine trees (23%). A preliminary analysis of flowering phenology indicates large overlap among species, with however a tendency for *C. mollissima* to bloom first, followed by *C. crenata*, *C. sativa*  $\times$  *C. crenata* hybrids, and finally *C. sativa* (Larue et al. 2021c).

### Paternity analysis with CERVUS

We selected 43 mother trees on which we collected between 40 and 95 burrs: 18 *C. sativa* trees from 3 astamine and 5 longistamine clones, 20 *C. sativa*  $\times$  *C. crenata* hybrids from 1 astamine and 7 longistamine clones, 2 *C. crenata* and 3 *C. mollissima*, each from a different longistamine clone. A total of 1939 seeds were used for paternity analysis. The results of the CERVUS analysis are summarized in Table 2. Of the 1939 studied seeds, 15 were excluded because their genotypes had more than 50% of missing data, 11 seeds are sired by an unknown father, presumably from outside the studied area, and we successfully identified the father of 1913 seeds (i.e. 98.7% of seeds) including 1825 assignation at the

Table 2: List of mother trees sampled and results of the paternity analysis for all genotyped seeds

Mother <sup>1</sup>		Father <sup>2</sup>		sativa		hybrid		crenata		mollissima		others		Total	
clone	ramet	species	flower	self	Migr	A	L	A	L	L	A	L	A	L	
1_16	A_64_Cs	<i>sativa</i>	A	0	1	3	19	12	1	1	2	2	39		
1_16	E_41_M	<i>sativa</i>	A	0	1	1	19	15	3	1			40		
1_16	E_82_O	<i>sativa</i>	A	0		2	6	30	2				40		
1_26	E_40_T	<i>sativa</i>	A	0			15	24		1			40		
1_26	E_80_O	<i>sativa</i>	A	2	1		21	14	1				39		
1_30	E_43_S	<i>sativa</i>	A	0			23	14	2	1			40		
1_30	E_47_S	<i>sativa</i>	A	0	1	1	18	4	15		1		40		
1_17	A_65_Fs	<i>sativa</i>	L	0			2	12	9	2		14	39		
1_17	E_43_C	<i>sativa</i>	L	2			28		3	3		4	40		
1_17	E_69_H	<i>sativa</i>	L	0	2		6	16	15		1		40		
1_23	E_39_A	<i>sativa</i>	L	14		1	9	11	2		2		39		
1_23	E_41_G	<i>sativa</i>	L	5		2	9	16				8	40		
1_29	E_43_O	<i>sativa</i>	L	0		1	12	14	6	3	4		40		
1_29	E_52_J	<i>sativa</i>	L	1		1	20	7		3	8		40		
1_29	E_53_M	<i>sativa</i>	L	0		1	22	11	4	1	1		40		
1_31	E_48_D	<i>sativa</i>	L	1		1	21	14	1	1	1		40		
1_35	E_52_N	<i>sativa</i>	L	1		4	24	7	1	1	2		40		
1_35	E_53_I	<i>sativa</i>	L	1			26	5	2	2	4		40		
2_33	A_58_Os	hybrid	A	1		2	6	39	3	17	1	26	95		
2_33	E_80_G	hybrid	A	1		1	29	37	25			1	94		
2_21	A_42_J	hybrid	L	9	3	10	10	38	21	2	1		94		
2_21	A_44_Qs	hybrid	L	2	1	2	3	42	32	8	5		95		
2_21	E_49_K	hybrid	L	2	1	2	5	28	14		1		53		
2_28	A_55_S1	hybrid	L	4		1	5	23	6				39		
2_32	A_55_S2	hybrid	L	0		1	2	34	2				39		
2_17	A_60_Qs	hybrid	L	5		1	1	7	17	3	6		40		
2_17	E_48_F	hybrid	L	2		1	12	13	8	4			40		
2_17	E_50_P	hybrid	L	1			1	4	33	1			40		
2_18	A_66_Qs	hybrid	L	1		3		31	3	1			40		
2_18	E_69_D	hybrid	L	0			1	8	31				40		
2_18	E_73_D	hybrid	L	0					10	10			20		
2_18	E_81_R	hybrid	L	3			2	24	11				40		
2_22	E_37_Q	hybrid	L	1			8	11	8	9	3		40		
2_22	E_66_I	hybrid	L	1			3	15	20		1		40		
2_22	E_82_M	hybrid	L	0		1	1	30	7				39		
2_23	E_50_L	hybrid	L	2				11	24		3		40		
2_23	E_65_L	hybrid	L	0			2	7	31				40		
2_23	E_72_E	hybrid	L	3			1	4	32				40		
3_3	A_41_Ns	<i>crenata</i>	L	0			1	29	4	5	1		40		
3_6	E_49_O	<i>crenata</i>	L	0		1	3	29	2	2	3		40		
4_17	A_62_Ms	<i>mollissima</i>	L	1				2	1	13	23		40		
4_12	A_65_Hs	<i>mollissima</i>	L	2			2		2	27	7		40		
4_10	E_45_I	<i>mollissima</i>	L	7				2	1	26	4		40		
Frequencies		<i>sativa</i>		0.038	0.008	0.025	0.419	0.006	0.335	0.073	0.025	0.000	0.071	1.000	
		hybrid		0.038	0.005	0.022	0.094	0.001	0.413	0.335	0.045	0.001	0.047	1.000	
		<i>crenata</i>		0.000	0.000	0.013	0.050	0.000	0.725	0.075	0.088	0.000	0.050	1.000	
		<i>mollissima</i>		0.083	0.000	0.000	0.017	0.000	0.033	0.033	0.550	0.000	0.283	1.000	

<sup>1</sup> Mother trees: clone code, ramet code, species and flower type.

<sup>2</sup> Father trees: self: number of selfed seeds; mig: number of seeds sired by fathers located outside of the study site; number of seeds sired by fathers from each species/flower type (A: astaminate and brachystaminate trees, L: mesostaminate and longistaminate trees).

strict threshold of 99%. Among the 1924 seeds correctly genotyped, 75 are self-pollinated (overall selfing rate of 3.9%).

Female selfing rate varies across trees, ranging from 0 to an extreme of 36% (14 out of 39 seeds). Most seeds were sired by conspecific trees: for *C. sativa* mother trees, 45% of seeds are sired by *C. sativa*; for *C. sativa* × *C. crenata* hybrid mother trees, 42% of seeds are sired by *C. sativa* × *C. crenata* hybrids; for *C. crenata* mother trees, represented by only seven clones in the study site, only 8% of seeds are sired by *C. crenata* and 73% by *C. sativa* × *C. crenata* hybrids; finally, for *C. mollissima* mother trees, 55% of seeds are sired by *C. mollissima*.

To further analyse the siring success of astamine trees (presumed to be at least partly male-sterile) and longistamine trees (presumed to be male-fertile), the results of the number of fruits mothered and fathered by each group of trees is provided in Table 3. Among the 1913 seeds with an identified father, only 51 (2.7%) are sired by an astamine tree, even though these trees represent 23% of the adult population studied, a 8.7-fold reduction in male fecundity compared to random mating expectations. The female selfing rate significantly differed between astamine trees (0.009) and longistamine ones (0.049) (Fisher's exact test,  $p < 10^{-4}$ ), but not the male selfing rate (0.078 versus 0.038, see Table 3). For longistamine trees, the female selfing rate (0.049) did not differ significantly from the male selfing rate (0.038). In contrast, for astamine trees, the female selfing rate (0.009) differed from the male selfing rate (0.078) (Fisher's exact test,  $p = 0.006$ ).

*Table 3: Comparison of the mating system of chestnut trees according to flower type (astamine and longistamine trees): number of seeds mothered and fathered, and estimates of male and female selfing rates*

	astamine	longistamine	all	Fisher's exact test
selfed seeds	4	71	75	
seeds mothered	463	1450	1913	
seeds fathered	51	1862	1913	
female selfing rate	0.009	0.049	0.039	$4 \cdot 10^{-5}$
male selfing rate	0.078	0.038	0.039	0.15
Fisher's exact test	0.006	0.17		

## Model performance

To illustrate how the model works and to check its performance, we first relied on the prediction of the specific composition of pollen pools received by each mother tree at different stages. As a starting point, we assumed random mating. The amount of pollen received is then proportional to the abundance of

each species (Figure 3, A). The next step corresponds to the composition of the pollen pool before pollination (Figure 3, B). This step reflects the proportion of the pollen of each species received by the female flowers, as shaped by the flowering phenology, the spatial distribution of the trees (Figure 1) and the pollen dispersal kernel. The proportion of conspecific pollen received increases strongly, principally because of self-pollination (not limited by self-incompatibility at this stage), spatial clustering of the species and homogamy caused by similarities in flowering phenology within species. The third step represents the action of both interspecific and selfing prezygotic barriers (Figure 3, C). Except in the case of *C. mollissima*, the net result does not benefit to conspecific pollen. For instance, for *C. sativa* × *C. crenata* hybrids, the majority of the pollen comes from *C. crenata*. The fourth step represents the action of late-acting self-incompatibility, a postzygotic barrier to selfing through abortion of selfed embryos (Figure 3, D). The proportion of conspecific pollen decreases sharply because of the removal of selfed seeds, which are by definition sired by conspecific pollen. The pollen pools predicted at this final stage can be directly compared with the proportion of seeds sired by each species as inferred using paternity analysis (Figure 3, E). The close patterns observed (Figure 3E) and predicted (Figure 3D) confirm that our model reached a very good fit, as further confirmed by regressions of observed over predicted proportions of each taxon in the pollen pool (Supplementary Figure 1).

Similarly, we predicted the proportions of self-pollen received by each mother tree at different steps. The first step is before pollination (Figure 4, A). It reflects the high proportion of self-pollen received by the mother trees, on average 59% (5-97). In the second step, the proportion of self-pollen is further shaped by prezygotic barriers against selfing (Figure 4, B). This results in a large decrease of self-pollen, down to 34% (2-83). The third step corresponds to the effect of late-acting self-incompatibility (Figure 4, C). The proportion of self-pollen falls down to 4% (0-19), due to the abortion of almost all ovules fertilized by self-pollen ( $\alpha_{si} = 0.95$ ). The last picture (Figure 4, D) illustrates the proportion of self-pollinated seeds of each mother-tree identified through paternity analysis. This proportion is low, around 4% (0-36), matching well with that produced by the fitted model. However, the number of selfing events varies among trees. For instance, 36% of seeds collected on tree E\_39\_A (*C. sativa*) are self-pollinated. The overall relationship between observed and predicted self-pollination is marginally not significant (F test,  $p = 0.06$ ,  $r^2 = 0.06$ ) but becomes significant after removing the tree (E\_39\_A) with unusually high selfing rate (F test,  $p = 0.023$ ,  $r^2 = 0.12$ , see Supplementary Figure 2).

### Parameter values and comparison with the standard MEMM model

Our new model, which combines a spatially explicit mixed-mating model based on paternity analysis and a fruit set model, was compared with the standard MEMM version, which does not include fruit set. The estimates of the parameters derived with each model are provided in Table 4.

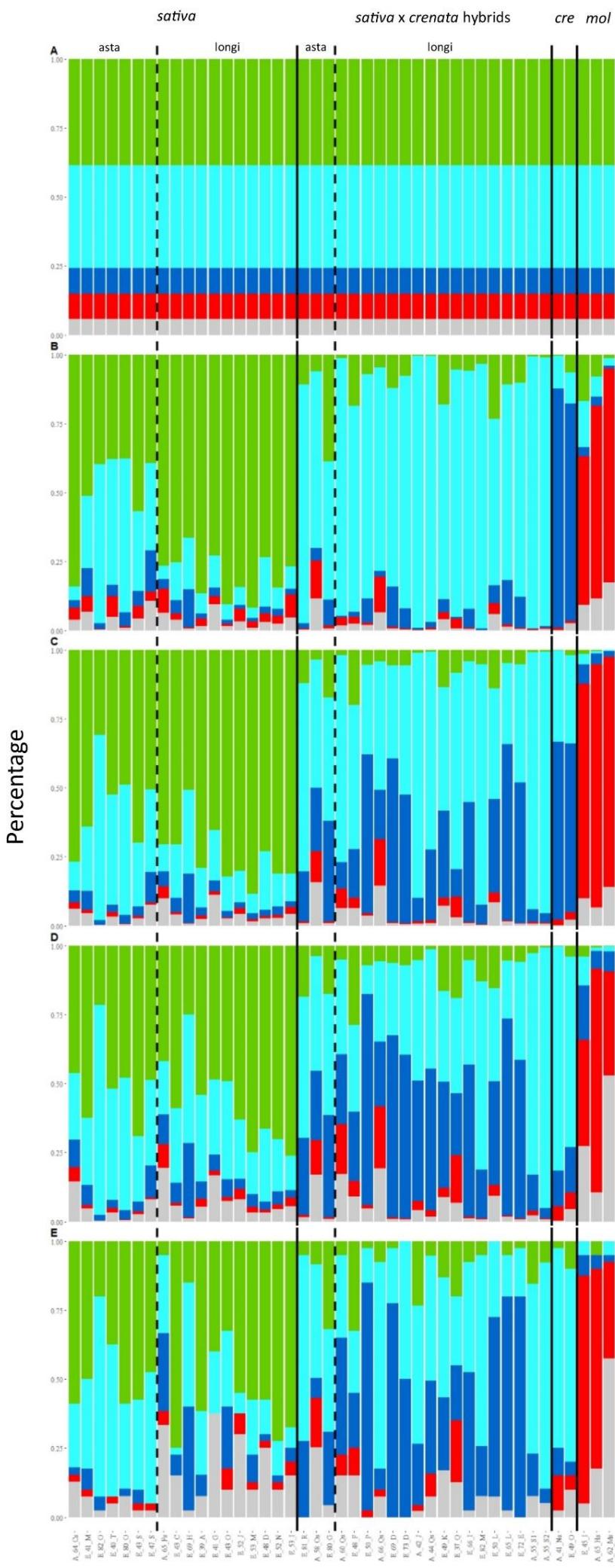


Figure 3: Species composition of the pollen pool received by each mother tree. Colours represent chestnut species: C. sativa is in green, C. sativa × C. crenata hybrids are in light blue, C. crenata is in dark blue, C. mollissima is in red and all other hybrids are in light grey. A) Pollen pools for each mother tree expected under random mating. B) Pollen pools predicted at the time of pollination. C) Pollen pools predicted after the expression of prezygotic barriers. D) Pollen pools predicted after the expression of postzygotic barriers. E) Proportion of seeds actually sired by each species for each mother tree.

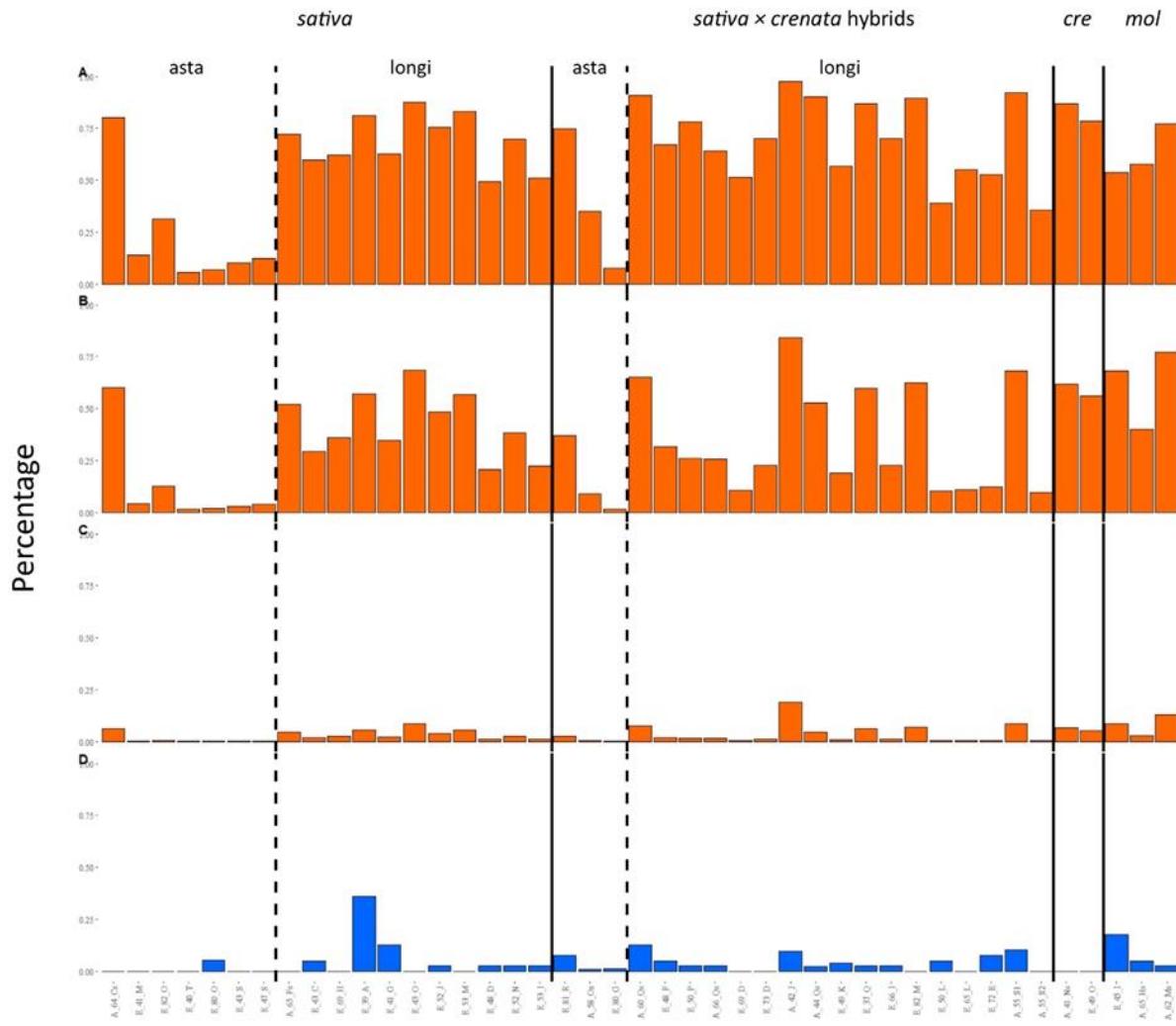


Figure 4: Proportion of self-pollen predicted and observed on each mother tree. A) Expected proportion of self-pollen arriving on the stigmas. B) Expected proportion of self-pollen after the operation of prezygotic barriers to selfing. C) Expected proportion of self-pollen after the operation of postzygotic barriers. D) Proportion of seeds of each mother tree actually resulting from a selfing event.

The likelihood of the standard version of MEMM is (as expected) higher than the likelihood of the corresponding genetic part of the new model: 62584 vs 62870, illustrating a better fit to that part of the data. Typical of fat-tailed dispersal functions, the kernel falls steeply at short distance and then much slowly at medium to (very) long distances: the quantity of pollen is reduced by a factor of 100 between 3 and 60 m, and then reduced by another factor of 100 between 60 and 700m (Figure 5). For comparison, we computed the distance between the parental trees of each seed with an assigned father. Since it is not possible to differentiate different ramets of the same clone using paternity analyses, we relied only on those seeds sired by trees having unique genotypes: 372 seeds could be used (Figure 6). The average distance between parents is 153 m (0-724). The migration rates of pollen originating from outside the site was similar with both models, at around 4.5% (Table 4). In contrast, paternity analyses identified only 11 seeds (0.6%) with unknown parents.

Table 4: Estimated values of the parameters of model 2

Abbreviation	Description	New model			Standard model		
		mean	CI <sup>1</sup> min	CI max	mean	CI min	CI max
<b>Likelihoods</b>							
-log( $L(data)$ )	Total likelihood	72239			nd		
-log( $L_{genet}$ )	Likelihood of seed genetic model	62870			62584		
-log( $L_{fructi}$ )	Likelihood of fruit-set model	9869			nd		
<b>Parameters</b>							
	variance of the random component of ♂						
$V_E$	fecundity per ramet	0.8	0.7	1.1	1.3	0.9	1.7
$mig$	migration rate from outside the site	0.045	0.036	0.055	0.046	0.036	0.056
	scale parameter of dispersal function						
$\delta$	(mean dispersal distance)	5618	1470	9760	2732	301	8944
$s$	shape parameter of dispersal function	0.07	0.06	0.09	0.09	0.06	0.15
$b_{SI}$	prezygotic barrier against selfing	0.19	0.14	0.26	0.0021	0.0002	0.0052
$a_{SI}$	survival rate of selfed embryos	0.05	0.03	0.06	nd	nd	nd
$\Delta_{opt1}$ (days)	onset of 1st ♂ peak - ♀ receptivity	-0.8	-3.5	1.8	-5.1	-9.4	-0.6
$\sigma_1$ (days)	standard error of onset of 1 <sup>st</sup> ♂ peak	13.5	12.1	15.2	14.7	12.3	18.4
<b>Interspecific barriers (h's)</b>							
S x CS	<i>sativa</i> x <i>hybrid</i>	0.56	0.39	0.78	0.50	0.30	0.81
S x C	<i>sativa</i> x <i>crenata</i>	0.46	0.26	0.74	0.51	0.25	0.93
S x M	<i>sativa</i> x <i>mollissima</i>	0.14	0.06	0.28	0.20	0.08	0.42
CS x S	<i>hybrid</i> x <i>sativa</i>	0.45	0.30	0.64	0.56	0.32	0.88
CS x C	<i>hybrid</i> x <i>crenata</i>	4.10	2.53	6.39	4.32	2.23	7.70
CS x M	<i>hybrid</i> x <i>mollissima</i>	0.69	0.35	1.24	0.89	0.40	1.81
C x S	<i>crenata</i> x <i>sativa</i>	0.08	0.02	0.21	0.28	0.04	0.95
C x CS	<i>crenata</i> x <i>hybrid</i>	0.80	0.46	1.28	0.64	0.18	1.66
C x M	<i>crenata</i> x <i>mollissima</i>	1.00	0.32	2.22	1.31	0.23	4.05
M x S	<i>mollissima</i> x <i>sativa</i>	0.01	0.00	0.04	0.01	0.00	0.02
M x CS	<i>mollissima</i> x <i>hybrid</i>	0.03	0.01	0.09	0.01	0.00	0.02
M x C	<i>mollissima</i> x <i>crenata</i>	0.37	0.13	0.77	0.06	0.01	0.18
<b>Effect on male fecundity</b>							
$v_1^2$	Fecundity of longi- vs. astamine flowers	4.9	3.4	7.0	15.0	8.0	28.7
$v_2$	Effect of canopy area on ♂ fecundity	0.16	0.01	0.32	0.41	0.21	0.62
$v_3$	Effect of catkin length on ♂ fecundity	0.20	0.06	0.35	0.38	0.19	0.57
<b>Effect on fruit set</b>							
$i$	intercept of the curve of the effects of covariates on fruit set	3.0	2.7	3.5	nd	nd	nd
$w_2$	Effect of canopy area on fruit set	0.8	0.4	1.5	nd	nd	nd
$w_3$	Effect of catkin length on fruit set	-0.2	-0.4	0.1	nd	nd	nd

<sup>1</sup> Credibility Interval

<sup>2</sup> exponential value of the effect

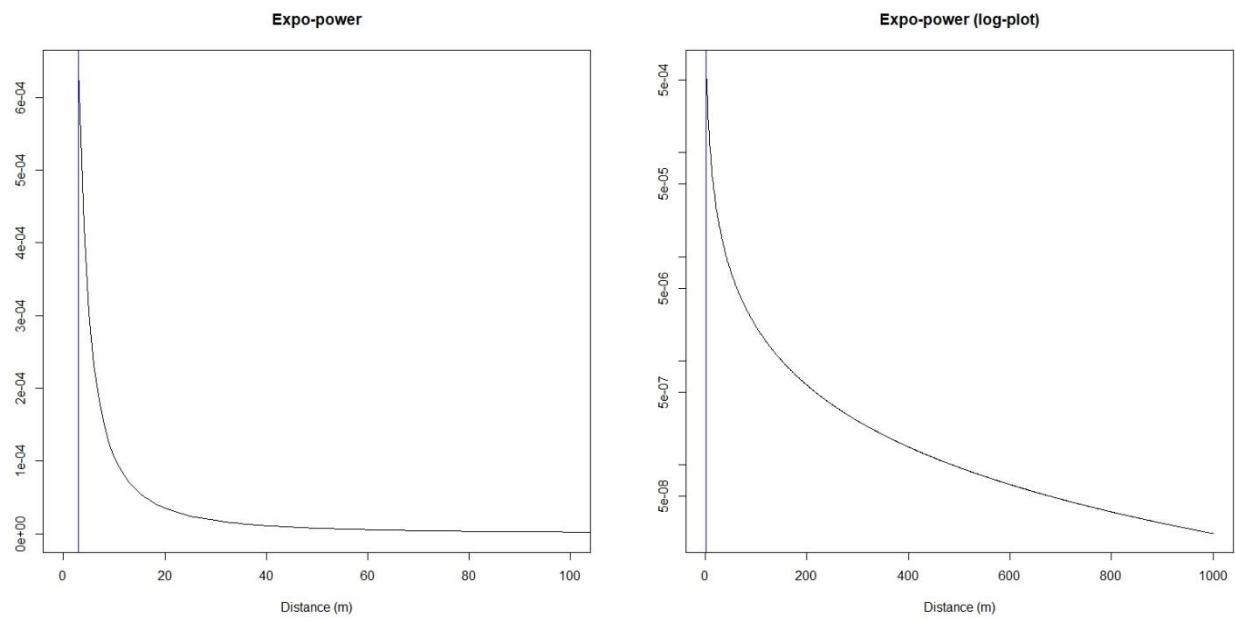


Figure 5: Pollen dispersal in chestnuts

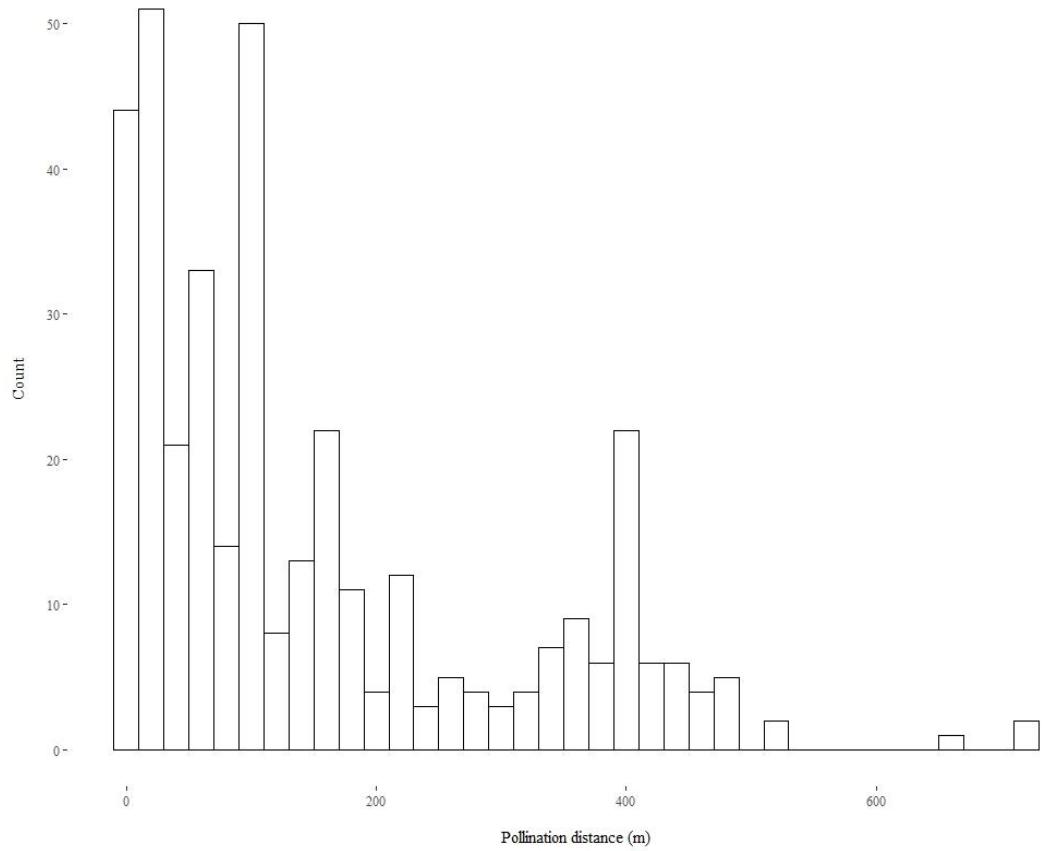


Figure 6: Distance between mother and father trees calculated with 372 seeds sired by a unique genotype

With the standard MEMM model, only the value of the prezygotic barrier against self-pollen can be estimated ( $bSI = 0.02$ , pointing to a 50-fold advantage for outcrossed pollen over selfed pollen). With the new model, two parameters are estimated instead: the prezygotic barrier against self-pollen ( $bSI = 0.19$ , pointing to a 5-fold advantage for outcrossed pollen over selfed pollen), and a rate of abortion of selfed-seeds caused by a mechanism of late-acting self-incompatibility (abortion rate = 95%, Table 4). In combination, these two mechanisms result in an overall estimate of selfing rate very close to that actually measured using paternity analyses, at around 4% (see Figure 4).

Regarding flowering phenology, we found that mating between trees is maximum when the onset of full flowering of unisexual male catkins occurs one day earlier than the onset of full receptivity of female flowers ( $\Delta_{opt1}$ ). However, the window of compatibility is relatively wide, since a flowering gap of +/- 14 days ( $\sigma_1$ ) only reduced the chances of pollination by a factor 10.

Male fecundity ( $F_k$ ) is on average 4.9 larger for longistaminate trees than for astaminate ones (Table 4 and Figure 7, left). The difference is lower than that found for siring success (8.7-fold difference observed, see above), which is itself lower than the prediction of the standard MEMM model (15-fold difference) (Table 4).

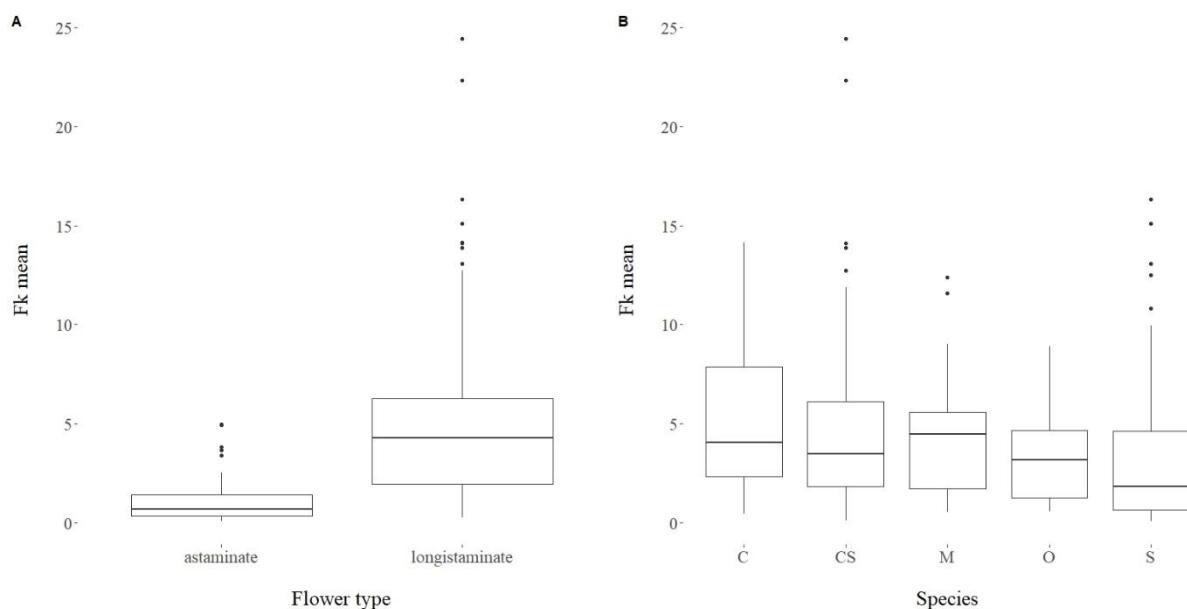


Figure 7: Individual male fecundities predicted according to trees' flower types (left) and species (right).

Male fecundity  $F_k$  varies less markedly according to species than according to flower type (Figure 7, right). It is on average 3.2 for *C. sativa*, 4.8 for *C. sativa* × *C. crenata* hybrids, 5.1 for *C. crenata*, 4.5 for *C. mollissima* and 3.2 for other hybrids. There is evidence for differences across species (Anova,  $p < 0.02$ ),

but the only significant pairwise comparison is that between *C. sativa* and *C. sativa* × *C. crenata* hybrids, the two most abundant and best sampled taxa, with hybrids having a slightly higher male fecundity (Tukey test,  $p < 0.02$ ).

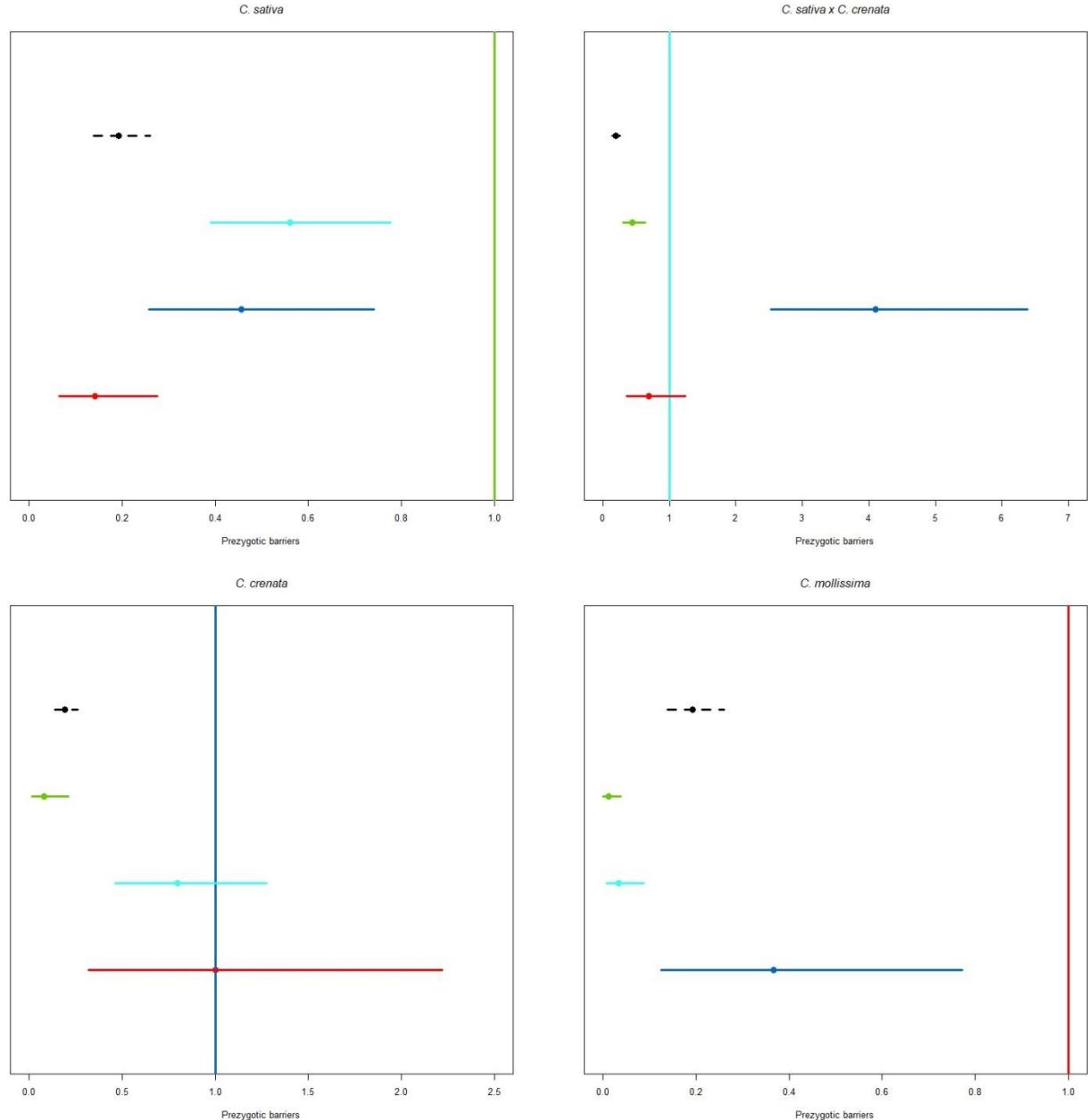


Figure 8: Interspecific barriers estimated for *C. sativa* mothers (top, left), for *C. sativa* × *C. crenata* hybrids mothers (top, right), for *C. crenata* mothers (bottom, left) and for *C. mollissima* mothers (bottom, right). Species are represented with different colours: *C. sativa* are in green, *C. sativa* × *C. crenata* in light blue, *C. crenata* in dark blue, *C. mollissima* in red, and average prezygotic selfing is in black.

Interspecific barriers estimated with the models are provided in Table 4 and Figure 8. For crosses on *C. sativa* mother trees, conspecific pollen is slightly favoured over that from *C. crenata* and

*C. sativa* × *C. crenata* hybrids and strongly favoured over that of *C. mollissima*. On mother plants of *C. sativa* × *C. crenata* hybrids, the pollen from *C. sativa* is counter-selected. In contrast, the pollen from *C. crenata* is strongly favoured. *C. crenata* has no barrier against *C. mollissima* pollen, a weak barrier with *C. sativa* × *C. crenata* hybrids but a strong barrier with *C. sativa*. Finally, *C. mollissima* has very strong interspecific barriers with all other species. In fact, in this species, at this prezygotic stage, even self-pollen is favoured over pollen from *C. sativa* and *C. sativa* × *C. crenata* hybrids.

We studied the relationship between siring success as measured with paternity analyses and the male fecundities estimated with the model. Because paternity analyses cannot distinguish among the different ramets of the same clone, we computed average values across ramets for the number of seeds sired and for male fecundities  $F_k$  (Figure 9A). There is a weak but significant positive relationship between male fecundity  $F_k$  and the average number of seeds sired ( $F$  test,  $p < 0.01$ ,  $r^2 = 0.08$ ).

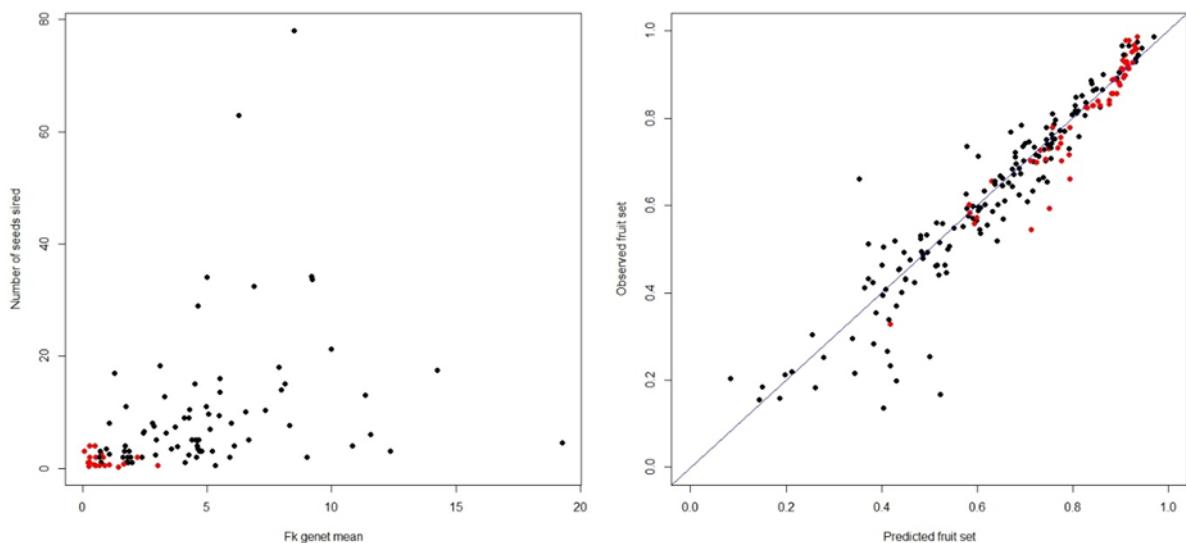


Figure 9: Relationship between observed siring success and male fecundity for each clone (left) and between observed and expected fruit set for each tree (ramet). Longistamine trees are in black and astaminous ones are in red.

In contrast, the predicted fruit set was very strongly correlated with observed fruit set ( $F$  test,  $p < 10^{-16}$ ,  $r^2 = 0.9$ ) (Figure 9B), confirming that our model for fruit set satisfactorily catches the underlying processes. In particular, Figure 9B shows that the predictions are good for both astaminous mother plants (red dots, larger fruit sets) and longistamine mother plants (black dots, widely variable fruit sets, including weak values) in the full range of observed values (from 0.17 up to 1.0). In our model, the abortion rate of selfed embryos almost completely determines fruit set. We also found a negative

relationship between male fecundity and fruit set not only between astamine and longistamine but also within each category of trees (Supplementary 2).

Catkin length had a positive effect on male fecundities but no effect on fruit set (Table 4). Canopy area had a positive effect on male fecundities (especially with the standard model) and a positive effect on fruit set (Table 4). To avoid the possible confounding effect of tree age on canopy area, we restricted the corresponding analyses to the largest, even-aged plot E (Supplementary 3). In this case, canopy area still had a positive effect on male fecundity ( $F$  test,  $p < 10^{-9}$ ,  $r^2 = 0.14$ ). In contrast, the relation with fruit set disappeared, unless the analyses were restricted to longistamine trees ( $F$  test,  $p = 0.05$ ,  $r^2 = 0.05$ ).

Our attempts with model 1, in which fruit set is determined not only by differential abortion rates but also by pollen limitation (i.e. based on pollen quantity), did not result in an improved fit compared to model 2 in which fruit set is determined only by differential abortion rates. This suggests that in the studied site, pollen limitation does not represent a significant process once differential abortion rates of selfed- and non-selfed seeds are accounted for.

## DISCUSSION

We successfully developed a spatially explicit individual-based model coupling the standard likelihood of pollen pool composition with the seed set likelihood. Hence, for the first time, female mating success and male fecundity were estimated in the same modelling framework. This is a long-awaited development, as these parameters had never been estimated together until now, preventing a comprehensive analysis of the effect of pollination on seed set. In theory, the pollen pool (pollen composition and pollen amount) should influence female mating success, as predicted early on by Levin (1988). This fully justifies coupling the two processes for more realistic predictions of seed set. Here, for the first time, the pollen cloud composition surrounding each female plant is used to predict seed set.

Our biological system proved very effective for these new developments. First, all trees could be nearly exhaustively geolocated, sampled, genotyped and phenotyped. Their fruit set was evaluated during two consecutive years using a simple but effective procedure, which closely reflects pollination success (sections 3.3. and 3.4.). We found that most mating events take place within the study site: gene flow from outside the study site (i.e. from distances  $> 1$  km, given our nearly exhaustive sampling strategy) involves as little as 0.6% of the seeds, as inferred using paternity exclusion. This left 1913 mating events with a single putative father. The father was identified in most cases with great confidence, providing a powerful platform for clarifying complex mating processes. Overall, the model proved very effective at predicting the pollen-pool composition and fruit set.

The major finding using this new integrated model is the negative consequence of self-pollination on fruit set. We had previously reported a large difference in fruit set according to trees' flower types (longistaminate or astaminate) (section 3.5.). We have now demonstrated that these different tree flower types correspond to male-fertile and largely male-sterile tree categories. We could successfully model the effect of self-pollination on fruit set with the help of a postzygotic barrier acting against selfed seeds, assuming that seed mortality depends on the proportion of self-pollen remaining after the action of prezygotic barriers. By combining this postzygotic barrier with a fine model for the amounts of incoming and self-pollen, we could explain very well the wide range of observed fruit set. We argue that this proves the importance of sexual interference, and our ability to reproduce this mechanism in equations. A further indication that sexual interference is taking place is the finding that for both male-fertile and male-sterile trees, increased male fecundity is associated with decreased fruit set, as expected if self-pollination results in ovule discounting. In chestnut, sexual interference was previously demonstrated using emasculation experiments. Following the emasculation of whole trees or branches, increased fruit set was observed in longistaminate (male-fertile) but not in astaminate (male-sterile) varieties (section 3.5.; Zongyun and Kuiying 2009). In combination with the prezygotic barrier acting against self-pollen, the postzygotic barrier against selfed seeds predicts low average selfing rates, matching well with the selfing rates measured with paternity analyses. However, some trees have unusually high selfing rates. This likely reflects variation in self-compatibility, a common finding in plants (Whitehead et al. 2018).

We also attempted to model the effect of pollen limitation using this dataset: however, the model did not behave well and we could not detect any effect of pollen limitation when simultaneously accounting for the postzygotic barrier to selfing. We hypothesise that in this site, characterized by large diversity of trees and abundant insect visitors (Larue et al. 2021a), pollen is not limiting, or only slightly so. Alternatively, it might be too difficult to disentangle the processes of self-interference from that of pollen limitation. Self-interference depends on the proportion of self-pollen, whereas pollen limitation depends on the amount of outcrossed pollen, two quantities that are strongly correlated: for instance, isolated longistaminate trees have simultaneously a high proportion of selfed pollen and few outcrossed pollen.

An important novel feature of the new model is the possibility to identify covariates for both male and female mating success. We found that male catkin length had a positive effect on male but not on female mating success, as expected. The finding of an effect of tree canopy area on male fecundity was expected, as most previous studies have reported a strong positive relation with tree size, including in insect pollinated species (Burczyk et al. 2002; Latouche-Hallé et al. 2004; Oddou-Muratorio et al. 2005). An effect of canopy area on fruit set, possibly restricted to male-fertile trees, needs confirmation. Canopy

size may exert some contrasting pressures on fruit set, as pollinating insects may preferentially visit large trees, whereas the negative effect of self-pollination should increase with plant size (de Jong et al. 1993).

The new model predicts a weaker contrast in male fecundity between astaminate and longistaminate trees (4.9 fold) than the standard pollen pool model (15 fold). One assumption made in these models is that the same dispersal kernel holds for all trees. The finding of greater male than female selfing rates in astaminate trees, unlike what is found in longistaminate trees, suggest that this might not be true, in line with our previous observation that the two types of trees attract slightly different insect visitors potentially differing in their flying abilities (Larue et al. 2021a).

Another possibility is that astaminate trees have a better fruit set than longistaminate ones not only because of their reduced pollen production, resulting in less sexual-interference, but also for other reasons, such as securing proportionnaly more insect visits to their female flowers compared to longistaminate trees. Indeed, the scattered female flowers are made more visible and possibly more attractive in the absence of staminated male flowers (Larue et al. 2021a).

Despite these remaining uncertainties, the model developed is remarkably informative and allowed exploring new mechanisms, for instance the largely neglected effect of self-pollen interference. The consideration of many species simultaneously, with barriers between each, results in particularly precise predictions on hybridization rates that will be useful for chestnut cultivation and conservation. The findings show that multiple and heterogeneous mating barriers can be clarified in species complex in a single experiment. The effect of male and female flowering dates on mating probabilities also appeared to work well and to improve significantly the predictions (results not shown). We also developed a complex but effective system of clone-ramet information with self-incompatibility among ramets of the same clone. Finally, we could, for the first time, investigate in parallel the effects of covariates on male fecundity and female pollination success rate. The results show that the same trait can have different, possibly opposite, effects on pollen emission and deposition.

Together, this represents an important step forward for both fundamental and applied pollination and mating system studies, with potential practical consequences for conservation and for orchards conception and management.

## CONTRIBUTIONS

Data curation was done by Clément Larue. Conceptualization of the model was done by Clément Larue, Rémy J. Petit and Etienne K. Klein. This model was coded by Etienne K. Klein. Validations were

performed by Clément Larue, Rémy J. Petit and Etienne K. Klein. Statistical analyses and illustration were performed by Clément Larue according to the advice of Rémy J. Petit and Etienne K. Klein. First draft of this article was jointly written by Clément Larue and Rémy J. Petit.

## REFERENCES

- Adams WT, Birkes DS (1991) Estimating mating patterns in forest tree populations. Biochemical markers in the population genetics of forest trees 157–172
- Adams WT, Birkes DS, Erickson VJ (1992) Using genetic markers to measure gene flow and pollen dispersal in forest tree orchards. Chapman and Hall
- Ahee J, Drunen W, Dorken M (2014) Analysis of pollination neighbourhood size using spatial analysis of pollen and seed production in broadleaf cattail (*Typha latifolia*). Botany 93:1–10. <https://doi.org/10.1139/cjb-2014-0169>
- Barrett S (2002) Sexual interference of the floral kind. Heredity 88:154–9. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800020>
- Bernasconi G (2003) Seed paternity in flowering plants: an evolutionary perspective. Perspect Plant Ecol Evol Syst 6:149–158. <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00075>
- Bontemps A, Klein EK, Oddou-Muratorio S (2013) Shift of spatial patterns during early recruitment in *Fagus sylvatica*: Evidence from seed dispersal estimates based on genotypic data. For Ecol Manag 305:67. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.05.033>
- Burczyk J, Adams WT, Moran GF, Griffin AR (2002) Complex patterns of mating revealed in a *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozyme markers and the neighbourhood model. Mol Ecol 11:2379–2391. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01603.x>
- 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. <https://doi.org/10.1038/hdy.1996.139>
- 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. <https://doi.org/10.1038/hdy.1997.210>
- Burd M (1994) Bateman's principle and plant reproduction: The role of pollen limitation in fruit and seed set. Bot Rev 60:83–139. <https://doi.org/10.1007/BF02856594>
- Chybicki IJ, Iszkulo G, Suszka J (2019) Bayesian quantification of ecological determinants of outcrossing in natural plant populations: Computer simulations and the case study of biparental inbreeding in English yew. Mol Ecol 28:4077–4096. <https://doi.org/10.1111/mec.15195>
- Chybicki IJ, Oleksa A (2018) Seed and pollen gene dispersal in *Taxus baccata*, a dioecious conifer in the face of strong population fragmentation. Ann Bot 122:409–421. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy081>
- Chybicki IJ, Oleksa A, Dering M (2021) Identification of determinants of pollen donor fecundity using the hierarchical neighborhood model. Mol Ecol Resour 21:781–800. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13307>
- de Jong TJ, Waser NM, Klinkhamer PG (1993) Geitonogamy: The neglected side of selfing. Trends Ecol Evol 8:321–325. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90239-L](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90239-L)
- Dicks LV, Breeze TD, Ngo HT, et al (2021) A global-scale expert assessment of drivers and risks associated with pollinator decline. Nat Ecol Evol 5:1453–1461. <https://doi.org/10.1038/s41559-021-01534-9>
- Gaüzère J, Klein EK, Oddou-Muratorio S (2013) Ecological determinants of mating system within and between three *Fagus sylvatica* populations along an elevational gradient. Mol Ecol 22:5001–5015. <https://doi.org/10.1111/mec.12435>

Harder L, Aizen M (2010) Floral adaptation and diversification under pollen limitation. *Phil Trans R Soc B* 365:529–43. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0226>

Harder LD, Barrett SCH (1996) Pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants. In: Lloyd DG, Barrett SCH (eds) *Floral Biology: Studies on Floral Evolution in Animal-Pollinated Plants*. Springer US, Boston, MA, pp 140–190

Harder LD, Wilson WG (1998) A clarification of pollen discounting and its joint effects with inbreeding depression on mating system evolution. *Am Nat* 152:684–695. <https://doi.org/10.1086/286199>

Hasegawa Y, Suyama Y, Seiwa K (2009) Pollen donor composition during the early phases of reproduction revealed by DNA genotyping of pollen grains and seeds of *Castanea crenata*. *New Phytol* 182:994–1002. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02806.x>

Hegland S, Totland O (2008) Is the magnitude of pollen limitation in a plant community affected by pollinator visitation and plant species specialisation levels? *Oikos* 117:883–891. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2008.16561.x>

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16:1099–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>

Klein E k., Oddou-Muratorio S (2011) Pollen and seed dispersal inferred from seedling genotypes: the Bayesian revolution has passed here too. *Mol Ecol* 20:1077–1079. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05020.x>

Klein EK, Desassis N, Oddou-Muratorio S (2008) Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. IV. Whole interindividual variance of male fecundity estimated jointly with the dispersal kernel. *Mol Ecol* 17:3323–3336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03809.x>

Klein EK, Lagache L, Petit RJ (2017) Demographic and spatial determinants of hybridization rate. *J Ecol* 105:29–38. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12674>

Knapp EE, Goedde MA, Rice KJ (2001) Pollen-limited reproduction in blue oak: implications for wind pollination in fragmented populations. *Oecologia* 128:48–55. <https://doi.org/10.1007/s004420000623>

Lagache L, Klein EK, Ducoussou A, Petit RJ (2014) Distinct male reproductive strategies in two closely related oak species. *Mol Ecol* 23:4331–4343. <https://doi.org/10.1111/mec.12766>

Lagache L, Klein EK, Guichoux E, Petit RJ (2013) Fine-scale environmental control of hybridization in oaks. *Mol Ecol* 22:423–436. <https://doi.org/10.1111/mec.12121>

Lander TA, Klein EK, Stoeckel S, et al (2013) Interpreting realized pollen flow in terms of pollinator travel paths and land-use resistance in heterogeneous landscapes. *Landsc Ecol* 28:1769–1783. <https://doi.org/10.1007/s10980-013-9920-y>

Larson B, Barrett SCH (2000) A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biol J Linn Soc* 69:503–520. <https://doi.org/10.1006/bijl.1999.0372>

Larue C, Austruy E, Basset G, Petit RJ (2021a) Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea* spp.): an integrated approach. *Bot Lett* 168:348–372. <https://doi.org/10.1080/23818107.2021.1872041>

Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021b) An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction. *Ann For Sci* 78:90. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01104-w>

Larue C, Barreneche T, Petit RJ (2021c) Efficient monitoring of phenology in chestnuts. *Sci Hortic* 281:109958. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109958>

Larue C, Guichoux E, Laurent B, et al (2021d) Development of highly validated SNP markers for genetic analyses of chestnut species. *Conserv Genet Resour*. <https://doi.org/10.1007/s12686-021-01220-9>

Latouche-Hallé C, Ramboer A, Bandou E, et al (2004) Long-distance pollen flow and tolerance to selfing in a neotropical tree species. *Mol Ecol* 13:1055–1064. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02127.x>

- Levin DA (1988) The paternity pools of plants. Am Nat 132:309–317. <https://doi.org/10.1086/284854>
- Matsuo A, Tomimatsu H, Suzuki J-I, et al (2014) Female and male fitness consequences of clonal growth in a dwarf bamboo population with a high degree of clonal intermingling. Ann Bot 114:1035–1041. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu176>
- Mitchell RJ, Flanagan RJ, Brown BJ, et al (2009) New frontiers in competition for pollination. Ann Bot 103:1403–1413. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp062>
- Oddou-Muratorio S, Gauzere J, Bontemps A, et al (2018) Tree, sex and size: Ecological determinants of male vs. female fecundity in three *Fagus sylvatica* stands. Mol Ecol 27:3131–3145. <https://doi.org/10.1111/mec.14770>
- Oddou-Muratorio S, Klein EK (2008) Comparing direct vs. indirect estimates of gene flow within a population of a scattered tree species. Mol Ecol 17:2743–2754. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03783.x>
- Oddou-Muratorio S, Klein EK, Austerlitz F (2005) Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. II. Pollen dispersal and heterogeneity in mating success inferred from parent–offspring analysis. Mol Ecol 14:4441–4452. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02720.x>
- Oddou-Muratorio SS, Bontemps A, Klein E, et al (2010) Comparison of direct and indirect genetic methods for estimating seed and pollen dispersal in *Fagus sylvatica* and *Fagus crenata*. For Ecol Manag 259:2151
- Ollerton J, Winfree R, Tarrant S (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? Oikos 120:321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
- Platt WJ, Hill GR, Clark S (1974) Seed production in a prairie legume (*Astragalus canadensis* L.). Oecologia 17:55–63. <https://doi.org/10.1007/BF00345095>
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche. <https://doi.org/URL https://www.R-project.org/>
- Reilly JR, Artz DR, Biddinger D, et al (2020) Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators. Proc R Soc B 287:20200922. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0922>
- Rodger JG, Bennett JM, Razanajatovo M, et al (2021) Widespread vulnerability of flowering plant seed production to pollinator declines. Sci Adv 7:eabd3524. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd3524>
- Roeder K, Devlin B, Lindsay BG (1989) Application of maximum likelihood methods to population genetic data for the estimation of individual fertilities. Biometrics 45:363–379. <https://doi.org/10.2307/2531483>
- Schoen DJ, Stewart SC (1986) Variation in male reproductive investment and male reproductive success in white spruce. Evolution 40:1109–1120. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1986.tb05737.x>
- Seavey SR, Bawa KS (1986) Late-acting self-incompatibility in angiosperms. Bot Rev 52:195–219. <https://doi.org/10.1007/BF02861001>
- Silander JA (1978) Density-dependent control of reproductive success in *Cassia biflora*. Biotropica 10:292–296. <https://doi.org/10.2307/2387681>
- Smouse PE, Sork VL (2004) Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. For Ecol Manag 197:21–38. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.05.049>
- Solignat G, Chapa J (1975) La Biologie florale du Châtaignier. Institut National de Vulgarisation pour les Fruits Légumes et Champignons, PARIS
- Stephenson AG (1981) Flower and fruit abortion: Proximate causes and ultimate functions. Ann Rev Ecol Syst 12:253–279
- Stoeckel S, Klein EK, Oddou-Muratorio S, et al (2012) Microevolution of S-allele frequencies in wild cherry populations: respective impacts of negative frequency dependent selection and genetic drift. Evolution 66:486–504. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01457.x>

Tani N, Tsumura Y, Kado T, et al (2009) Paternity analysis-based inference of pollen dispersal patterns, male fecundity variation, and influence of flowering tree density and general flowering magnitude in two dipterocarp species. Ann Bot 104:1421–1434. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp252>

Totland O, Sottocornola M (2001) Pollen limitation of reproductive success in two sympatric alpine willows (Salicaceae) with contrasting pollination strategies. Am J Bot 88:1011–5. <https://doi.org/10.2307/2657082>

Waser NM, Price MV (1989) Optimal outcrossing in *Ipomopsis aggregata*: Seed set and offspring fitness. Evolution 43:1097–1109. <https://doi.org/10.2307/2409589>

Whitehead MR, Lanfear R, Mitchell RJ, Karron JD (2018) Plant mating systems often vary widely among populations. Front Ecol Evol 6:38. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00038>

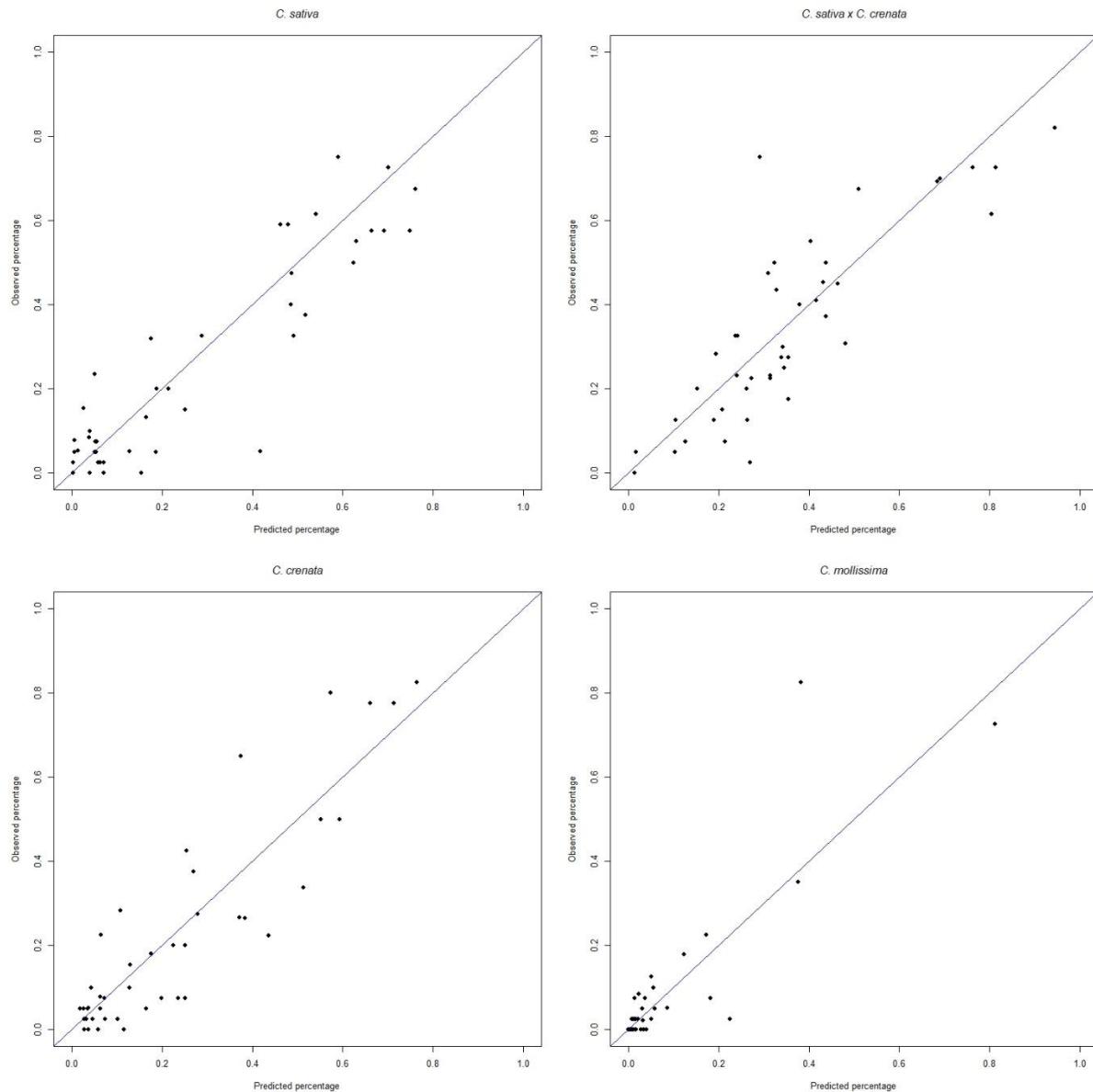
Wilcock CC, Neiland MRM (2002) Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. Trends Plant Sci 7:270–277. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02258-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02258-6)

Xiong H, Zou F, Guo S, et al (2019) Self-sterility may be due to prezygotic late-acting self-incompatibility and early-acting inbreeding depression in Chinese chestnut. J Am Soc Hortic Sci 144:172–181. <https://doi.org/10.21273/JASHS04634-18>

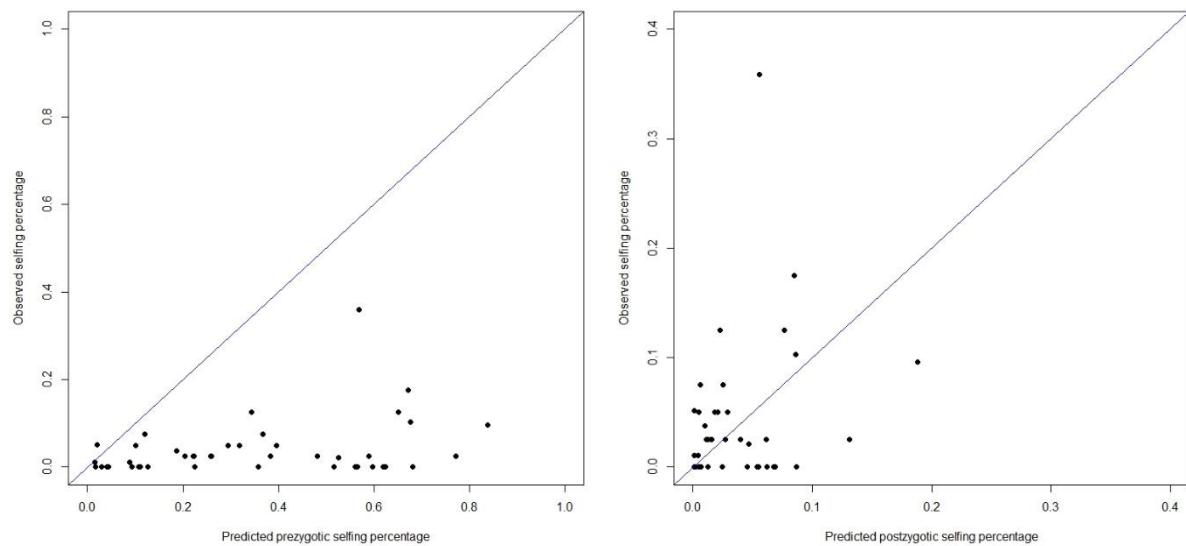
Zongyun Z, Kuiying L (2009) Effect of chemical thinning catkins on Chinese chestnut yield and quality. Acta Hortic 457–460. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.844.64>

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Supplementary figure 1:** Observed versus predicted proportion of fathers from each taxon. All relations where highly significant, with  $r^2 \geq 0.7$ .



**Supplementary figure 2:** Observed versus predicted selfing rate, before (left) and after (right) the expression of prezygotic barrier against selfing. None of the relation was significant, but the second one became significant after removing the outlier with a selfing rate higher than 0.3 (see text)



## **Supplementary 1: Parameters used in paternity analysis with CERVUS**

- 1) Allelic frequencies calculated with the 113 unique genotypes from INRAE intensive study plot (INRAE collection and trees outside of the campus)
- 2) Simulation for paternity analyses:
  - 100 000 offspring
  - Candidate fathers = 112 / Pop. Sampled = 0.98
  - SNP: Prop. loci typed = 0.99 / Prop. loci mistyped = 0.03
  - Confidence = Delta
  - Confidence levels = Relaxed = 95% / Strict = 99%
  - Min loci typed = 34
  - Option test for self-fertilisation
- 3) Paternity analysis: identify the most-likely parent

## Supplementary 2: Relationship between fruit set and male fecundity

We first studied the relationship between fruit set and model-based estimates of male fecundity  $F_k$ . The relationship between male fecundity  $F_k$  and fruit set is significant both for longistaminate ( $F$  test,  $p < 0.009$ ,  $r^2 = 0.08$ ) and astaminate trees ( $F$  test,  $p < 10^{-8}$ ,  $r^2 = 0.43$ ): as expected, the higher the male fecundity  $F_k$ , the lower the observed fruit set. The relationship between the random part of fecundity  $E_k$  and fruit set is not significant for longistaminate trees ( $F$  test,  $p = 0.08$ ) but it is highly significant for astaminate trees ( $F$  test,  $p < 10^{-9}$ ,  $r^2 = 0.45$ ): the lower the fruit set, the higher the value of  $E_k$ , i.e. astaminate trees with a low fruit set are poorly explained by the model (see figure 1).

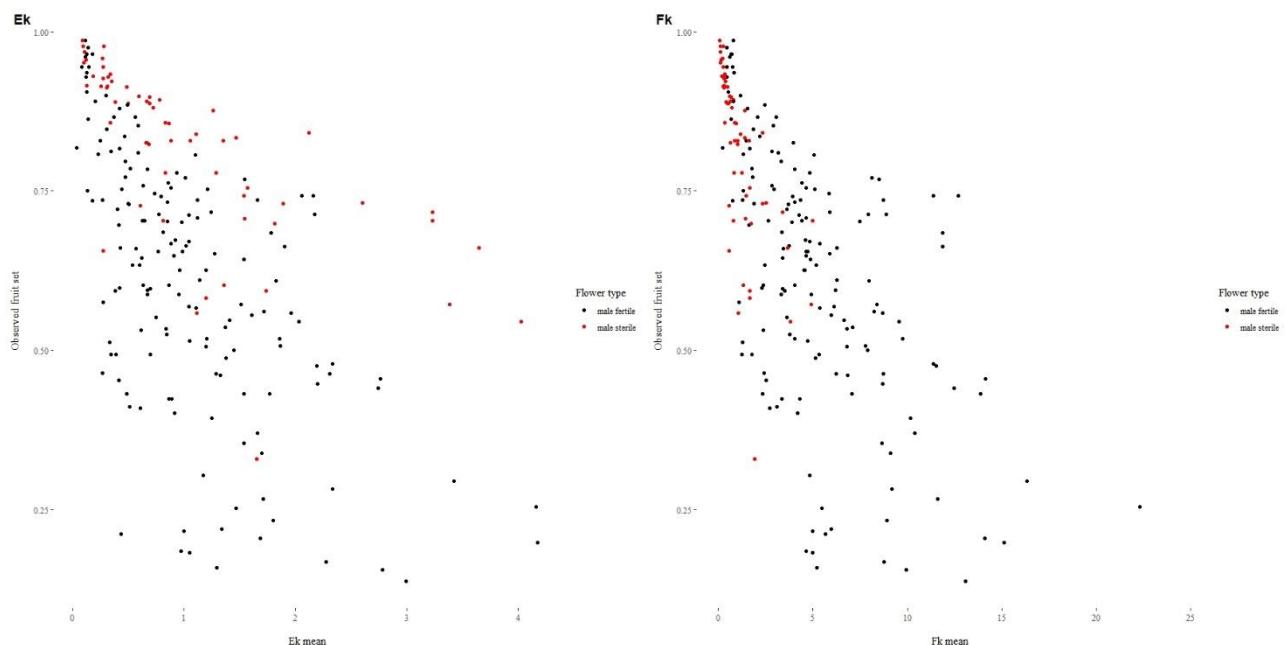


Figure 1 of Supplementary 2: Relationship between observed fruit set and  $E_k$  (left) and  $F_k$  (right). Longistaminate trees are in black and astaminate ones are in red.

We then studied the relationship between clonal fruit set and number of seeds sired. There was no significant relationship between observed clonal fruit set (averaged across all ramets) and clonal siring success (F test,  $p = 0.8$ ,  $r^2 < 0.01$ , see figure 2 below).

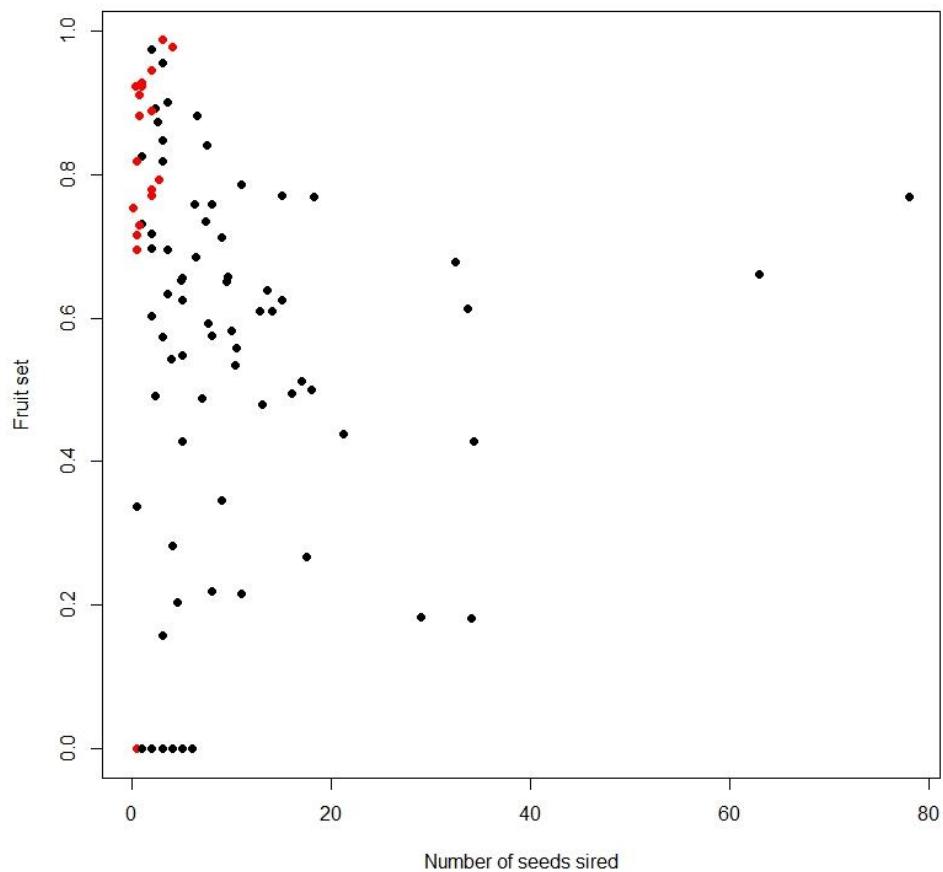


Figure 2: Relationship between observed clonal fruit set (averaged across all its ramets) and the number of seeds sired (male mating success). Each dot represents a genet from INRAE chestnut collection. Longistamineate varieties are in black and astaminata ones are in red.

### Supplementary 3: Effects of covariates

We studied the relationship of two covariates, canopy area and catkins length, with male fecundity Fk (figure 1). The larger the tree, or the longer the catkins, the more pollen the tree can produce, and the greater the male fecundity should be. Trees from plots A and E are studied separately, because the A orchard is much older, and trees are therefore much larger. In plot A, there is no relationship between canopy area and male fecundity Fk (F test,  $p$ -value = 0.7) but in plot E, the relationship is significant (F test,  $p < 10^{-9}$ ,  $r^2 = 0.14$ ): as expected, the larger the trees, the higher Fk is (figure 1, left). When only male-fertile trees are studied, the relationship remains significant (F test,  $p < 0.03$ ,  $r^2 = 0.03$ ). The relationship between catkins length and fecundity is positive and significant but not very informative (F test,  $p = 0.013$ ,  $r^2 = 0.03$ ) (figure 2, right). If we only consider longistaminate trees, the relationship is no longer significant (F test,  $p$ -value = 0.05,  $r^2 = 0.02$ ).

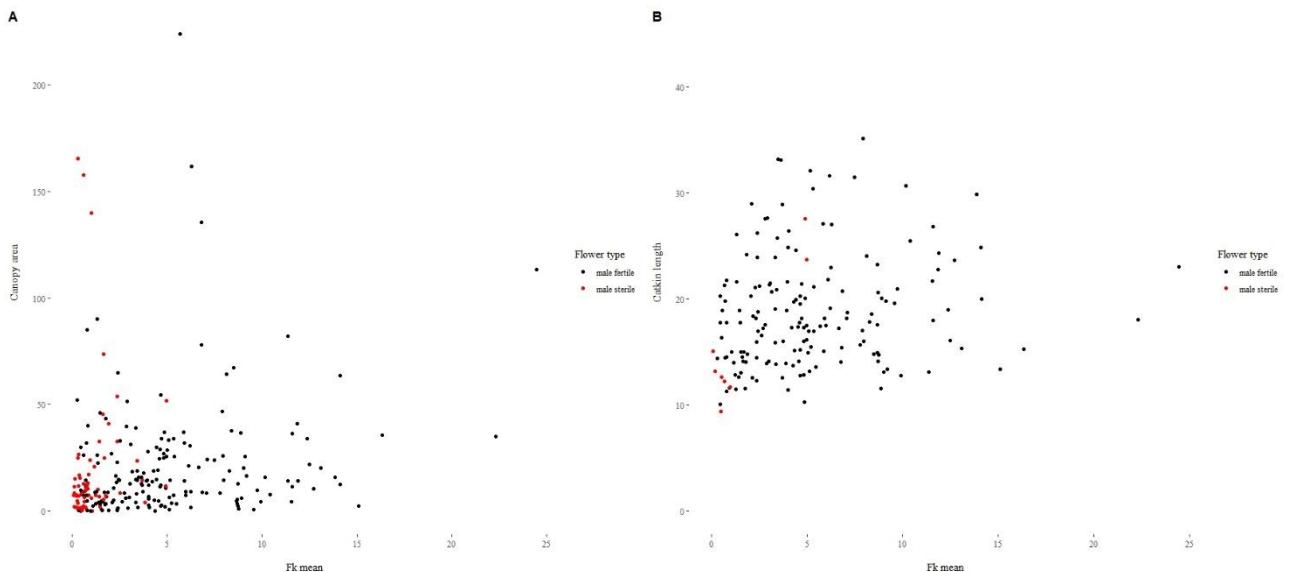
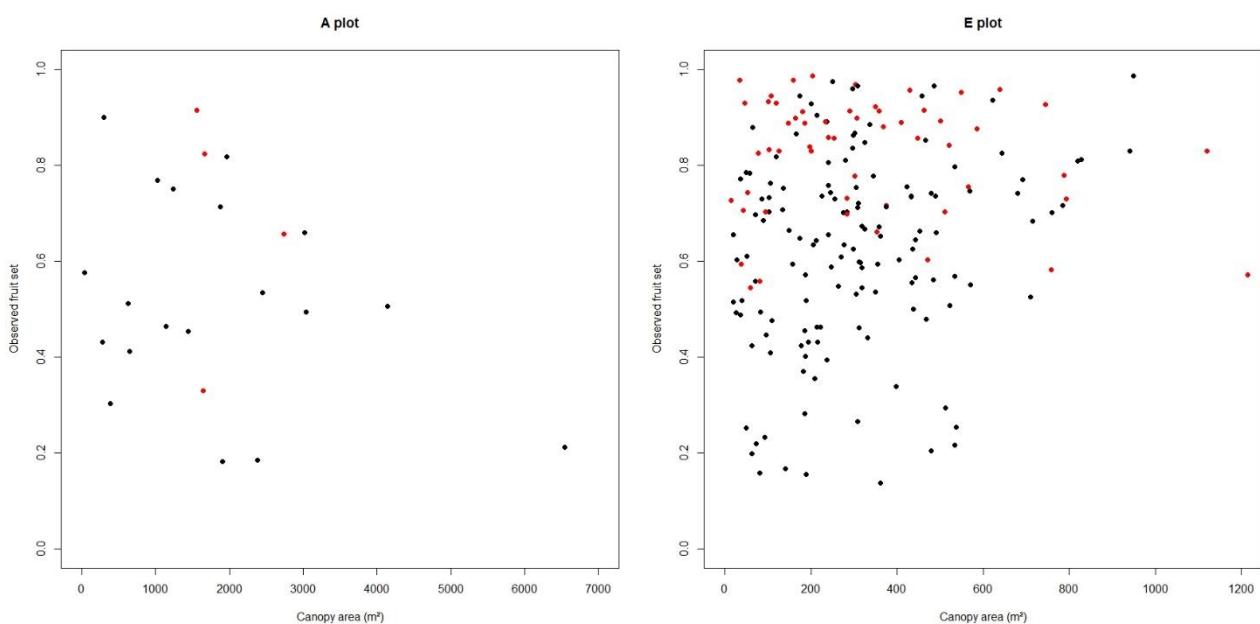


Figure 1: Relationship between canopy area and Fk (left) and catkin length and Fk (right). Longistaminate trees are in black and astaminate ones are in red.

Trees from plot A are older and larger than trees from E plot, so the relationship between fruit set and canopy area was tested separately for the two orchards (figure 2). In plot A, there is no relationship between fruit set and canopy area for both astaminate and longistaminate trees (F test,  $p = 0.2$ ). In plot E, there is again no relationship between fruit set and canopy area for astaminate trees (F test,  $p = 0.9$ ), but in longistaminate trees, trees with larger canopies have higher fruit set (F test,  $p < 0.005$ ).



*Figure 2: Relationship between observed fruit set and canopy area size. Results for the A plot are on the left and those for the E plot are on the right. Male fertile trees are in black and male sterile trees are in red. Each dot represents one tree (ramet) of the INRAE chestnut collection.*

# Chapitre 5

---

La pollinisation expliquée :  
transfert et communication





Clément Larue  
@ClementLarue1



...

Chestnut trees are flowering. It's the perfect time to visit orchards with chestnut producers to tell them about our work on chestnut pollination. 🌳🌰



7:43 PM · Jun 22, 2021 · Twitter Web App



## Préambule

Ma thèse s'est déroulée dans le cadre d'un partenariat entre une entreprise, Invenio, et un organisme de recherche, Biogeco (thèse Cifre). J'ai eu la chance de pouvoir écouter, discuter et présenter à de nombreuses reprises mes travaux au grand public, aux castanéiculteurs, et aux autres professionnels du monde de la châtaigne (10 exposés pendant ma thèse). Durant ces rencontres riches en échanges, j'ai découvert que faire passer un message clair et convaincre un auditoire n'est pas une chose aisée, notamment lorsque celui-ci a été désinformé par des « experts » de la pollinisation, ou par les rares ouvrages techniques peu rigoureux. Dans cette introduction, je vous présente, en essayant de les organiser un peu, quelques-unes de mes modestes réflexions autour de commentaires reçus de la part des acteurs de la castanéiculture (les citations sont en *italique*), afin de tenter de comprendre les sources d'incompréhension possibles pour m'aider à mieux communiquer sur les résultats de mes recherches. Bien souvent, les problèmes identifiés sont liés à des lacunes ou erreurs dans la littérature technique mais aussi de façon plus problématique aux approches réductionnistes qui y sont prônées, que j'essaye ainsi d'identifier au travers des échanges que j'ai pu avoir.

### Manque de rigueur

Un « expert » de la pollinisation a apparemment expliqué que « *l'est de la France est sec, tandis que l'ouest est humide. La pollinisation [du châtaignier] est donc assurée par le vent à l'est et par les insectes à l'ouest* ». J'ai retrouvé cette phrase dans plusieurs ouvrages sur le châtaignier à destination des professionnels, sans qu'il soit possible d'identifier l'auteur de ces affirmations, ni sur quels éléments de preuves il s'appuyait. De même, une étude de la distance de dispersion du pollen de châtaignier par le vent avec des plaques collantes est souvent citée, mais il m'a été impossible de retrouver les détails de l'expérience. On pourrait aussi citer l'idée que plus les filaments d'étamines sont longs, plus ces étamines produiraient du pollen. Cette relation est mentionnée dans la littérature technique à destination des castanéiculteurs. La fertilité du pollen serait donc liée à la longueur du filet de l'étamine ? Dans ce cas, mes résultats d'analyse de paternité indiquent qu'une corrélation existe bien, mais tant que le mécanisme n'est pas compris, il est dangereux de généraliser. Là aussi, il m'a été impossible de trouver trace des données correspondantes.

### Mythes et désinformation

« *J'ai entendu parler du verger mono variétal de 'Bouche de Béthizac' de M. Untel, il produit 3 tonnes de fruits par hectare, et il n'y a aucun donneur de pollen* ». « *Le châtaignier aime faire de la parthénogénèse* » ... « *Les châtaignes sont issues d'autofécondation* » ... La pollinisation du châtaignier est un sujet chaud, et de nombreuses théories ont émergé, peut-être en partie en l'absence de travaux de référence. Mes analyses de paternité ont pu casser

certains de ces mythes. Non, le châtaignier ne fait pas de parthénogénèse et les autofécondations sont rares, ne permettant jamais d'obtenir à elles seules un rendement correct. Il est pourtant facile de trouver en pépinières des plants de châtaignier appartenant à des variétés étiquetées « autofertiles ». Ces informations constituent des arguments marketing non vérifiés et trompeurs : j'ai par exemple trouvé la mention « variété autofertile » pour la variété 'Bouche de Bétizac', un hybride mâle-stérile qui ne peut s'autoféconder que très exceptionnellement. De même, mes résultats montrent qu'il n'est pas possible qu'un verger monovariétal réellement isolé produise des fruits en quantité. Le pollen provient forcément de l'extérieur, ou alors il y a de nombreuses variétés inconnues du castanéiculteur dans ce verger. La pollinisation croisée du châtaignier est quasi obligatoire, et si on veut une bonne production de fruits, il faut que de nombreuses variétés soient plantées.

### Un problème de vocabulaire ?

En français, on désigne les arbres qui produisent le pollen, et les insectes qui le transportent, par un même terme : ce sont des arbres ou des insectes « pollinisateurs », ce qui peut provoquer des confusions. La langue anglaise est beaucoup plus précise, dans ce cas : l'arbre donneur de pollen est appelé « *pollenizer* » et les insectes « *pollinators* ». Ainsi, on comprend qu'il peut y avoir des problèmes aux différentes étapes du processus de pollinisation : « *Pollenizer limitation* » quand il n'y a pas assez d'arbres donneurs de pollen, « *pollinators limitation* » quand il n'y a pas assez d'insectes pollinisateurs. Une autre difficulté rencontrée en s'exprimant en français dans le langage courant concerne la différence entre le concept de reproduction et celui de « l'appariement » (*mating* en anglais). Par exemple, comment faire pour évoquer en français le concept de *mating success* ? J'ai utilisé l'expression de « succès d'appariement (femelle) », même si c'est un peu laborieux. En français, une plante peut « engendrer » des descendants, en tant que père ou que mère. En anglais, le *siring success* évoque exclusivement le succès à se reproduire en tant que père, un terme bien utile, mais qui n'a malheureusement pas d'équivalent simple en français : on compte sur le contexte pour clarifier les choses. Dès que l'on a les mots précis, il est plus facile de communiquer sur un sujet donné, sauf s'ils sont trop alambiqués, trop techniques ou trop savants.

### Inertie cognitive

Pendant longtemps, le châtaignier a été décrit comme étant pollinisé par le vent, alors que sa pollinisation est en fait assurée très majoritairement par les insectes (chapitre 2). Il est difficile de changer d'avis lorsque l'on pense quelque chose depuis longtemps. Une illustration de ce phénomène qui m'a particulièrement marquée est la conception récente d'une grande plantation, représentant un investissement considérable. Il avait été prévu que les arbres donneurs de pollen soient plantés face au vent mais assez loin de la plupart des arbres producteurs, en espérant que le vent disperse efficacement leur pollen. Malgré mes objections argumentées, le projet n'a pu être modifié. Cet exemple me semble pouvoir illustrer un cas

d'inertie cognitive (McGuire 1960) : l'être humain a tendance à s'appuyer sur des concepts familiers et a des difficultés à les réviser même lorsque de nouveaux éléments remettent en cause leur exactitude.

## Volonté de contrôle

*« Je mets des ruches dans mon verger, les abeilles doivent ainsi polliniser le châtaignier ».* L'abeille domestique est le premier insecte pollinisateur auquel on pense, et il est facile d'installer des ruches pour contrôler leur abondance, en espérant recevoir en échange miel et fruits en abondance. Mais l'abeille domestique n'est pas toujours le pollinisateur le plus efficace. Dans le cas du châtaignier, les abeilles récupèrent du pollen et du nectar pour en faire du miel (le fameux « miel de châtaignier »), mais ne visitent presque jamais ses fleurs femelles : ce sont des visiteuses du châtaignier en fleur, pas des pollinisatrices.

*« Pour avoir une meilleure pollinisation, il faut brasser l'air autour des châtaigniers ! Pourquoi ne pas mettre des ventilateurs ou faire passer des hélicoptères au-dessus des vergers ».* Un producteur a eu cette idée pour améliorer la pollinisation et ainsi la production de fruits. Ce producteur de châtaignes est volontaire et ingénieux, mais il faudra à l'avenir réfléchir aux pratiques qui sont favorables aux insectes pollinisateurs, plutôt que de chercher des solutions techniques de plus en plus complexes pour un service que peut assurer la biodiversité.

*« Pour augmenter l'abondance des insectes pollinisateurs sur les fleurs du châtaignier, il faut faucher les plantes herbacées qui fleurissent en même temps sous les arbres ».* Pas de crainte à avoir ce de côté-ci, les vergers de châtaignier sont très attractifs pour les insectes. Par contre, pour que des insectes pollinisateurs soient présents en abondance lorsque les vergers sont en fleurs, il faut qu'ils aient trouvé des ressources tout au long de leur cycle de développement. La fauche printanière de la végétation herbacée dans les vergers a toutes les chances d'être non seulement inutile mais contre-productive : il va falloir identifier et faire connaître les pratiques agricoles favorables aux pollinisateurs.

Au lieu de chercher à tout contrôler dans un agrosystème ultra-simplifié, les producteurs vont devoir accepter de lâcher du lest, essayer de comprendre ce qui se passe, et mettre à profit les services écosystémiques de la nature (Stassart et al. 2012 ; Papy 2013).

## Réductionnisme

L'agronomie telle qu'elle a été enseignée durant les décennies précédentes avait un fort penchant pour les approches réductionnistes : les systèmes agricoles complexes étaient simplifiés, décomposés en différents éléments étudiés séparément (Chevassus-au-Louis 2006). La castanéiculture n'y a pas échappé : il fallait simplifier les vergers et chercher à tout contrôler. Ainsi, les vergers « modernes » du Sud-Ouest ne sont plus composés que de quelques variétés. De même, pour sélectionner les meilleurs donneurs de

pollen, on procède de façon particulièrement réductionniste : je prends du pollen de la variété A, je pollinise manuellement, et je mets un sac sur l'inflorescence femelle. Je compte ensuite le nombre de fruits produits, et je classe la variété paternelle en fonction du nombre de fruits qu'elles engendrent. Premièrement, cette pollinisation croisée artificielle ne reflète pas la réalité, car c'est toujours un mélange pollen qui arrive sur la fleur femelle. Deuxièmement, les différents grains de pollen n'arrivent pas en même temps, et ne sont pas tous compétitifs.

Dans ce cadre d'une évolution vers des systèmes de plus en plus simplifiés et de décomposition extrême jusqu'à l'absurde, de simples observations de terrain ont pu induire les producteurs en erreur : « *J'ai planté un verger de 'Bouche de Bétizac' et de 'Marigoule', 'Bouche de Bétizac' fait plein de fruits tandis que 'Marigoule' n'en fait aucun. Dans le prochain verger, je ne planterai que 'Bouche de Bétizac'* ». Ce raisonnement est simple, mais erroné. Il va conduire ce producteur à commettre une erreur aux conséquences lourdes lors de la plantation de ce nouveau verger. Ce n'est pas que 'Bouche de Bétizac' se contente de peu, et que 'Marigoule' est plus difficile. C'est juste que ces deux variétés interagissent entre elles, l'une pollinisant l'autre, et qu'ainsi leur fonctionnement quand elles sont séparées n'est pas le même que quand elles sont associées. Ce point illustre la nécessité de réfléchir en termes de système (l'écosystème) où le tout n'est pas réductible à la somme des parties du fait des interactions entre organismes vivants : c'est à cette condition que la révolution agro-écologique pourra avoir lieu.

Il convient donc de réfléchir à la meilleure manière d'accompagner cette transition dont on voit qu'elle risque de se heurter à de nombreuses idées reçues. Dans ce chapitre, je commence par présenter deux articles en français destinés au grand public et aux producteurs de fruits et légumes dans lesquels je parle de la pollinisation du châtaignier. En ayant à l'esprit les difficultés énoncées ci-dessus, j'ai d'abord et avant tout souhaité communiquer, vu le manque d'informations actualisées dans la littérature technique. Je compte poursuivre dans cette voie, en contribuant notamment à la rédaction des ouvrages techniques de référence à destination des agriculteurs : j'ai ainsi récemment été sollicité pour participer à la rédaction de la seconde édition de la monographie « Châtaignes et marrons » publiée par le Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes (Breisch 1995).

Le premier article de ce chapitre, intitulé « **Ce que la vie amoureuse du châtaignier nous enseigne de l'agroécologie** », a été publié dans *The Conversation*, à l'occasion de la fête de la Science 2020. C'est la suite de l'exposé que l'on avait fait, avec Rémy, lors de l'événement *Pint of science* en 2018. En utilisant des exemples concrets, nous détaillons les étapes clés de la pollinisation par les insectes du châtaignier, et nous cherchons à casser le mythe de l'auto-compatibilité des variétés fruitières promu par les pépiniéristes. Nous n'avons pas hésité à évoquer, y compris en utilisant des termes volontairement un peu décalés (« la vie amoureuse... »), des interactions biotiques sophistiquées (« Laissez les fleurs duper

les coléoptères») : en effet, l'enjeu identifié était de faire prendre conscience des relations parfois sophistiquées existant entre plantes et insectes, cruciales pour assurer la production de fruits. Nous mettons aussi en scène les raisonnements simplistes et la limite de l'empirisme, en espérant que ce soit plus parlant ainsi : « *J'ai la même variété que ma cousine, mais alors qu'elle récolte plein de fruits, j'ai des rendements catastrophiques* ».

Le second article intitulé « **Diversifier pour mieux polliniser** », a été réalisé à la suite d'une interview pour la revue Réussir Fruits & Légumes, une revue destinée aux producteurs de fruits et légumes. Après avoir rappelé que le châtaignier est entomophile, j'aborde les notions de diversité génétique des donneurs de pollen, de compatibilité temporelle entre les variétés plantées au sein du verger, et j'explique que toutes les variétés de châtaignier ne produisent pas de pollen. Cet article donne quelques conseils pour la conception des nouveaux vergers assurant une bonne pollinisation. Là aussi, je n'ai pas hésité à aborder des questions impliquant des interactions biotiques un peu subtiles : « *Pourquoi ces insectes visitent-ils ces fleurs femelles au look de fleurs mâles mais non attractives d'un point de vue alimentaire ?* ».

Enfin, je présente un extrait du projet déposé aux trophées du développement durable de la Dordogne 2020, intitulé « **Vers une meilleure pollinisation du châtaignier** », avec lequel j'ai décroché le prix de « coup de cœur du jury ». Pour ce concours, j'avais présenté mon projet de thèse, et j'ai tenté d'expliquer comment, en mêlant des approches d'agroécologie, de génétique et de modélisation, j'étudie dans son ensemble la pollinisation du châtaignier, un arbre emblématique du Périgord.

## REFERENCES

- Breisch H (1995) Châtaignes et Marrons. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, Paris, France
- Chevassus-au-Louis B (2006) Refonder la recherche agronomique: leçons du passé, enjeux du siècle. Leçon inaugurale du groupe ESA, Angers 27:
- Hasegawa Y, Suyama Y, Seiwa K (2017) Flowering phenology of a duodichogamous self-incompatible tree species, *Castanea crenata*. Jpn J Ecol 67:31–39. [https://doi.org/10.18960/seitai.67.1\\_31](https://doi.org/10.18960/seitai.67.1_31)
- McGuire WJ (1960) Cognitive consistency and attitude change. J Abnorm Soc Psych 60:345–353. <https://doi.org/10.1037/h0048563>
- Papy F (2013) L'agronomie entre logos et nomos. Nat Sci Soc 21:211–212. <https://doi.org/10.1051/nss/2013103>
- Stassart PM, Baret P, Grégoire J-C, et al (2012) L'agroécologie: trajectoire et potentiel. Pour une transition vers des systèmes alimentaires durables. Agroécologie, entre pratiques et sciences sociales 27–51



# Ce que la vie amoureuse du châtaignier nous enseigne de l'agroécologie

Clément LARUE<sup>a,bet al.</sup>, Rémy J PETIT<sup>a</sup>(\*)

<sup>a</sup>Univ. Bordeaux, INRAE, BIOGECO, 33610 Cestas, France

<sup>b</sup> INVENIO, Maison Jeannette, 24140 Douville, France

Consultable sur le site de The Conversation : <https://tinyurl.com/k5ktcuew>



Figure 1 : Les insectes et notamment les coléoptères (ici le téléphore fauve, à gauche, et une trichie commune), sont de bons pollinisateurs du châtaignier.

Quoi de plus agréable en ce début d'automne que de savourer des fruits de saison ? Mieux encore, si on a la chance de disposer d'un jardin, pourquoi ne pas les produire soi-même ? Voici quelques leçons de botanique et d'écologie utiles pour s'assurer une belle récolte.

Posons-nous d'abord quelques questions simples : d'où vient le pollen fécondant les fleurs et comment est-il transporté ? Pour cela, prenons l'exemple du châtaignier, l'arbre de nos ancêtres. Magnifique, capable de vivre des centaines d'années et d'atteindre une circonférence de plus de 10 mètres, il a subvenu

aux besoins essentiels des habitants de plusieurs régions d'Europe du Sud de la fin du Moyen Âge au XIX<sup>e</sup> siècle. Mais à compter de la révolution industrielle, produire sans labourer devient contraire au nouvel idéal de progrès, et un mauvais procès est fait au châtaignier et à sa culture. Puis au mépris des vertus du châtaignier a succédé l'oubli.

Malgré l'arrivée de maladies et ravageurs exotiques entraînant des dépeuplements locaux, on assiste aujourd'hui à un renouveau des châtaigneraies, porté par des consommateurs en quête d'authenticité. Les producteurs de châtaignes, appelés castanéiculteurs,



Figure 2 : Châtaignier couvert de fleurs dans un verger : l'extrême abondance de la production de pollen a longtemps été interprétée comme une preuve que cette espèce était pollinisée par le vent, mais si on empêche l'accès des fleurs aux insectes, très peu de fruits sont produits.

sont confrontés à une production hétérogène et ont décidé de soutenir des recherches sur la reproduction du châtaignier afin de faire évoluer sa culture par une meilleure compréhension des mécanismes écologiques sous-jacents.

Ces travaux nous serviront à illustrer quelques enjeux de l'agroécologie, la science appliquant les principes de l'écologie à l'agriculture. Des principes tout aussi valables pour votre jardin ou le parc voisin !

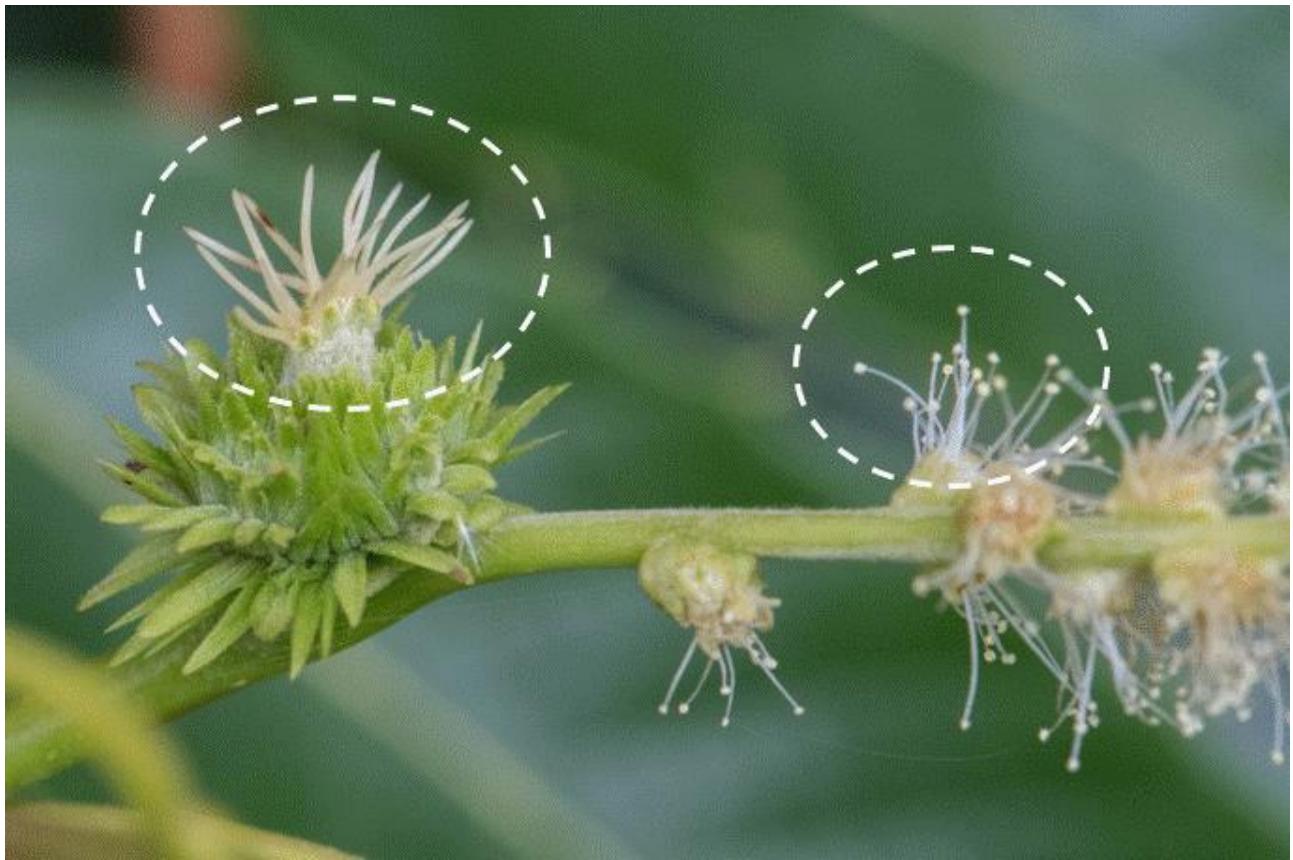
## PLANTEZ PLUSIEURS VARIETES D'UNE MEME ESPECE

Les arbres fruitiers, comme toutes les plantes à fleurs, possèdent des étamines où sont produits les grains de pollen, et des pistils contenant les ovules et équipés pour capter les grains de pollen. La pollinisation correspond au transport du pollen émis par les étamines vers les stigmates, la partie réceptrice du pistil. À première vue, un arbre pourrait donc se débrouiller seul dès lors qu'il est à la fois mâle et femelle : c'est l'autofécondation. Mais chez la plupart des arbres, celle-ci ne fonctionne pas ou très mal : le pollen émis doit obligatoirement rencontrer les

stigmates portés par les fleurs d'un autre arbre.

Ainsi, notre châtaignier a besoin de pollen produit par d'autres arbres compatibles pour se reproduire et porter des fruits. Or la culture de cet arbre est basée sur des variétés, c'est-à-dire des arbres aux caractéristiques particulièrement intéressantes repérés puis multipliés à l'identique par greffage. Par exemple, dans le Périgord, les variétés les plus courantes sont appelées Marigoule et Bouche de Bétizac. Deux arbres d'une même variété étant génétiquement identiques, ils sont incompatibles. Il faut donc planter des arbres appartenant à des variétés différentes pour espérer récolter des fruits.

« J'ai la même variété que ma cousine, mais alors qu'elle récolte plein de fruits, j'ai des rendements catastrophiques ». Peut-être que le jardin de ma cousine est situé à côté d'un autre verger ou d'un bois de châtaigniers produisant du pollen compatible en abondance et lui assurant ainsi une belle récolte. Au contraire, si mon verger est isolé et ne compte qu'une seule variété de châtaignier, le rendement ne sera jamais au rendez-vous, quelle que soit la variété choisie. Mieux vaut donc dans tous les cas planter suffisamment de variétés dans un verger et au moins



*Figure 3 : Quand les fleurs femelles imitent les fleurs mâles. Portion de chaton de châtaignier, comportant une inflorescence femelle à la base dont les extrémités réceptrices blanchâtres et allongées (cf. cercle pointillé de gauche) ressemblent aux étamines des fleurs mâles qui produisent à leur extrémité des grains de pollen (cercle pointillé de droite).*

deux arbres différents si c'est pour un jardin !

## OFFREZ AUX INSECTES LE GITE ET LE COUVERT

Il faut aussi se poser la question du transport du pollen d'une variété à une autre : par le vent ou par les insectes ? Confier son destin au vent est si aléatoire que les arbres ainsi pollinisés doivent nécessairement produire de grandes quantités de grains de pollen de petite taille. Cela devrait rendre facile l'identification du mode de pollinisation de ces plantes.

Dans le cas du châtaignier pourtant, la question est restée sans réponse des botanistes depuis plus de 140 ans. Il produit une quantité gigantesque de pollen (estimée à deux mille milliards de grains de pollen par hectare), ce qui a longtemps conduit certains à penser que le vent pourrait jouer un rôle dans sa reproduction. Mais comment interpréter la forte odeur suave de ses fleurs, si ce n'est pour attirer des insectes ? Les châtaigniers ne laissent d'ailleurs pas les abeilles indifférentes, comme vous le confirmeront tous les amateurs de miel de châtaignier !

Nos travaux indiquent que ce n'est pas le vent mais bien les insectes qui jouent un rôle essentiel dans la pollinisation du châtaignier. En plaçant autour des fleurs des filets conçus pour empêcher les insectes d'y accéder, nous avons montré que la production de châtaignes était divisée par cinq ou par dix. Il faut donc pouvoir bénéficier de l'aide des insectes polliniseurs pour espérer récolter des châtaignes, mais lesquels ? Les abeilles ?

## LAISSEZ LES FLEURS DUPER LES COLEOPTERES

Les fleurs mâles du châtaignier produisent d'énormes quantités de pollen très nutritif ainsi que du nectar.

Les fleurs femelles n'offrent pas de récompense aux insectes mais ont l'apparence des fleurs mâles, ce qui augmente leurs chances d'être visitées par erreur et fécondées. Tous les insectes ne sont pas dupes du stratagème : les abeilles par exemple tirent profit de l'abondance du pollen des fleurs mâles sans pour autant rendre visite aux fleurs femelles.

À l'inverse, d'autres insectes tombent dans le panneau :

c'est le cas des coléoptères, cette famille très ancienne et très diversifiée dont font partie les scarabées, coccinelles et autres hannetons. Recouverts du pollen abondant et collant d'un autre châtaignier visité plus tôt, ils sont victimes de l'illusion. Espérant à tort trouver une récompense chez les fleurs femelles, ils assurent ainsi la production des fruits.

Pour augmenter le rendement dans les vergers, il est donc inutile d'y installer des souffleries en espérant favoriser la pollinisation par le vent, ou même d'y multiplier le nombre de ruches. Il convient plutôt de rendre le verger et ses abords accueillants aux insectes sauvages, en leur assurant toute l'année le gîte et le couvert.

Nos recherches sur cet arbre confortent ainsi trois messages plus généraux de l'agroécologie.

En premier lieu, maintenir une diversité génétique suffisante de l'espèce cultivée est déterminant. C'est vrai à court terme, pour assurer la reproduction croisée, mais aussi à plus long terme, pour assurer la stabilité de la production dans un contexte marqué par des changements environnementaux très rapides et drastiques.

En deuxième lieu, maintenir une diversité d'espèces d'insectes associées et souvent auxiliaires des cultures est également crucial. En particulier, les populations d'insectes sauvages assurant la pollinisation doivent absolument être préservées. Pour les châtaigniers, il n'y a pas d'alternative possible !

Enfin, troisième message, en agriculture, mieux vaut chercher à comprendre ce qui se passe plutôt que de se fier à sa seule expérience. C'est la clé pour apporter des réponses adaptées quand les circonstances changent : là réside toute la beauté de la science et l'art véritable du paysan... ou du jardinier du dimanche.

## Diversifier pour mieux polliniser

Interview de Clément Larue, par Maud le Corre pour la revue Réussir Fruits et légumes



Figure 1 : Le téléphore fauve, un coléoptère, est l'insecte le plus observé sur les fleurs femelles du châtaignier pendant la floraison.

Les mécanismes en jeu dans la pollinisation des châtaigniers étaient jusqu'alors peu connus. Une thèse montre l'importance de la diversité génétique pour assurer cette pollinisation entomophile.

Les producteurs de châtaignes constatent des différences de production pour une même variété entre vergers, qui ne s'expliquent pas par la conduite. Une des hypothèses est que ces variations sont liées au succès de la pollinisation. Pour mieux comprendre les mécanismes en jeu, une thèse a été lancée il y a bientôt trois ans portés par Invenio et INRAE. Les premiers résultats montrent des mécanismes de pollinisation assez atypiques pour un arbre fruitier. Premier doute levé : le châtaignier est bien entomophile. « En entourant des rameaux de châtaigniers de filets, la production de fruits chute de près de 80 à 90 % selon nos observations », pose Clément Larue, thésard Cifre à INRAE, recruté par Invenio. D'autres études corroborent ce résultat. Des coléoptères comme polliniseurs

Au vu des observations sur le site INRAE de Villenave d'Ornon, les principaux polliniseurs ne seraient pas des abeilles mais des coléoptères. « Nous avons photographié à dix reprises pendant 20 minutes tous les insectes qui se posaient sur 16 châtaigniers avant, pendant et après la floraison, détaille le jeune chercheur. Et nous avons analysé les photos en séparant les insectes par taxon et par type de fleur visitée. » Ce travail a permis de montrer quels insectes étaient floricoles et parmi ceux-ci lesquels étaient bien impliqués dans la pollinisation des fleurs femelles de châtaignier. Si les abeilles domestiques et autres hyménoptères sont bien présentes pendant la période floraison, elles sont en revanche très peu présentes sur les fleurs femelles, considérées comme « trompeuses » (car n'offrant pas de récompense, mais ressemblant aux fleurs mâles qui produisent du pollen et du nectar). « Les insectes les plus observés sur les fleurs femelles pendant la floraison sont des coléoptères et plus spécifiquement le téléphore fauve (*Rhagonycha fulva*) », indique le chercheur. « Cet insecte représentait près de



Figure 2 : Un rameau de châtaignier est composé de chatons unisexués et d'autres bisexués

Un rameau de châtaignier est composé :

- de chatons unisexués composés uniquement de fleurs mâles qui produisent du nectar : elles constituent près de 98% des fleurs mâles
- des chatons bisexués composés de trois fleurs femelles dépourvues de nectar et de fleurs mâles avec nectar

50 % des photos prises ». Pourquoi ces insectes visitent-ils ces fleurs femelles au look de fleurs mâles mais non attractives d'un point de vue alimentaire ? On l'ignore encore, mais plusieurs hypothèses sont avancées dont certaines seront testées au printemps prochain. Second constat : le châtaignier est auto-incompatible. Le pollen d'une variété ne peut pas polliniser les fleurs femelles de la même variété. Pire encore, trop de pollen de la même variété apporté par les insectes provoquerait l'avortement des ovules. Un fait qui expliquerait que la quantité de pollen produit par une variété soit négativement corrélée à sa production de fruits (mais positivement corrélée à celle des autres variétés du verger !).

## PRENDRE EN COMPTE LA DIVERSITE ET LES CHATAIGNIERS SAUVAGES

Pour que des châtaignes se forment sur un arbre donné

il y a donc nécessité d'avoir des insectes polliniseurs apportant du pollen d'arbres polliniseurs appartenant à d'autres variétés. Une fleur femelle non pollinisée produit des fruits aplatis vides. « Mais il faut aussi qu'il y ait concordance des dates de floraisons », insiste Clément Larue. Un premier pic d'émission du pollen issu des chatons unisexués à lieu au début de la période de réceptivité des fleurs femelles et un second, issu des chatons bisexués, environ 15 jours après. « Pour assurer une pollinisation des fleurs femelles par du pollen d'une autre variété, il semble donc nécessaire d'assurer une bonne diversité variétale afin d'être sûr que des fleurs mâles d'une variété émettent du pollen pendant la période de réceptivité des fleurs femelles d'une autre variété », avance le thésard. Le pollen du châtaignier est collant, et les insectes impliqués dans la pollinisation, les coléoptères tels les téléphores fauves, ne semblent pas se déplacer très loin. L'estimation de la distance moyenne parcourue par un grain de pollen est en cours (voir



Figure 3 : La fleur femelle ressemble aux fleurs mâles mais ne produit ni pollen ni nectar (voir encadré)

encadré) mais elle serait de l'ordre de la dizaine de mètre. « C'est donc d'abord au sein même du verger que cette diversité génétique est souhaitable », précise-t-il. Pour les producteurs, un compromis est à trouver entre ces diversités et les contraintes de récolte qui en découlent. L'environnement de la parcelle peut être aussi à prendre en compte, la présence de châtaigniers sauvages aux abords de la parcelle augmentant cette diversité génétique. « La présence de ces châtaigniers sauvages pourrait peut-être expliquer une production résiduelle dans certains vergers univariétaux, qui sont néanmoins à proscrire complètement », indique Clément Larue.

### DES VARIETES AVEC OU SANS POLLEN

L'argument en faveur de l'introduction de plus de diversité dans les vergers est d'autant plus fort que toutes les variétés ne produisent pas de pollen. Les variétés longistaminées possèdent des fleurs mâles avec étamines et produisent du pollen, c'est le cas par

exemple de Marigoule. Les variétés astaminées, quant à elles, ont des fleurs mâles avec des étamines avortées et ne produisent donc pas de pollen, c'est le cas de Bouche de Bétizac. Lorsqu'un verger est constitué de deux variétés longistaminées, les fleurs femelles peuvent être pollinisées par le pollen de l'autre variété si les floraisons sont concomitantes. Mais si un verger est composé d'une variété astaminée et d'une autre longistaminée, par exemple Bouche de Bétizac et Marigoule, cette dernière va manquer de pollen. « Les variétés astaminées ont tendance à être plus productives que les variétés longistaminées », note Clément Larue. Deux explications sont avancées. « Nous constatons que les fleurs femelles sont plus visitées par les coléoptères sur les variétés astaminées. Une hypothèse est que ces fleurs femelles sont plus visibles lorsque les fleurs mâles sont sans étamines. Elles ne sont pas perdues dans les chatons mâles comme dans les variétés longistaminées ». L'autre est le fait, expliqué plus haut, que les ovules avortent lorsque les stigmates reçoivent trop d'autopollen (le



Figure 4 : Une fleur mâle est composée d'un glomérule d'où sortent les 12 étamines.

pollen produit par la variété elle-même). L'ensemble de ces résultats pointent du doigt la nécessité de revoir la

conception des vergers de châtaigniers pour en améliorer la production.



### Avis d'Expert

Clément Larue, thésard Invenio et INRAE

**“Nous développons un modèle mathématique”.**

Des résultats de ma thèse sont encore en cours d'analyse et de validation. Nous avons notamment développé un outil qui permet de faire des analyses de paternité et ainsi de savoir quelle est la variété père de chaque fruit. Ce travail pourrait nous permettre de voir si certaines variétés sont de meilleurs polliniseurs que d'autres et de détecter s'il existe des incompatibilités entre variétés. L'ensemble de ces résultats pourrait permettre de construire un modèle mathématique. Avec ce modèle mathématique, on espère pouvoir connaître les distances moyennes de dispersion du pollen et proposer un ratio optimal d'arbres « polliniseurs » et « d'arbres producteurs »

## Vers une meilleure pollinisation du châtaignier



Figure 1 : J'ai reçu le prix de « coup de cœur du jury » lors des trophées du Développement durable organisées par le conseil départemental de la Dordogne pour projet « Vers une meilleur pollinisation du châtaignier »

### DESCRIPTION DU PROJET

Le châtaignier, espèce emblématique du Périgord, est une essence à double fins : il est cultivé pour ses fruits comestibles, les châtaignes, dans des vergers composés d'arbres greffés, et c'est aussi un arbre forestier dont le bois est très recherché en menuiserie. Il permet par ailleurs la production d'un miel très apprécié. Le châtaignier est souvent décrit comme étant pollinisé principalement par le vent, comme le chêne et le hêtre, qui appartiennent à la même famille botanique, mais cela n'a en fait pas été démontré.

Le châtaignier est au centre d'une forte économie pour la Dordogne qui possède deux centres d'expérimentation travaillant sur la châtaigne avec Invenio qui est un des plus grands centres européens sur ce produit. Il y a également des pépiniéristes, de nombreux producteurs, des usines de transformations, des associations de défense et de valorisation du produit (Label Rouge Marron du Périgord), des animations locales avec de nombreuses fêtes de la châtaigne et un attrait touristique indéniable avec une

Maison qui lui est consacrée à Villefranche du Périgord.

Cet écosystème repose sur la châtaigne dont les récoltes fluctuent, ce qui peut mettre en péril tout ou partie de ces acteurs.

L'objectif du projet est de permettre que la pollinisation se fasse au mieux pour garantir une production régulière. Il repose sur les travaux conduits par Clément Larue, originaire de Dordogne, au travers d'une thèse de doctorat CIFRE sur la pollinisation du châtaignier. Elle s'effectue en partenariat entre Invenio (Station d'expérimentation de la filière fruits et légumes en Nouvelle Aquitaine) et une unité de recherche, Biogeco (unité mixte de recherche INRAE – Université de Bordeaux).

Cette thèse s'articule autour de quatre axes :

- 1) Est-ce que la production de châtaignes est limitée par la quantité et la qualité du pollen ?
- 2) Quelle est la part de la pollinisation liée au vent et celle liée aux insectes ? Et comment favoriser les

insectes pollinisateurs pour cet arbre ?

3) D'où provient le pollen qui a fécondé la fleur, à l'origine du développement des fruits ? Nous utilisons des analyses moléculaires pour retrouver l'arbre-père (donneur de pollen) à l'origine de la formation de chaque châtaigne. Proviennent-il des arbres forestiers voisins ou du verger ? Dans le dernier cas, de quelle variété provient-il ? Quelle distance a-t-il parcouru ?

4) Quel est l'impact de l'itinéraire cultural et de l'environnement du verger sur le rendement ? Les vergers où la diversité est la plus importante sont-ils

plus productifs ?

A ce stade du projet, nous avons pu montrer le rôle prépondérant des insectes : en leur absence la production s'effondre de 80 % sur un essai. Le travail donc ensuite consisté à identifier ces insectes. En se basant sur un suivi photographique et en faisant appel à une approche de sciences participatives, plus de 130 espèces d'insectes ont été identifiées, mais tous ne pollinisent pas efficacement le châtaignier : cet arbre dépend des insectes sauvages et notamment des coléoptères, les abeilles (y compris l'abeille domestique) ne jouant qu'un rôle mineur

Pour en savoir plus, l'intégralité du projet est disponible sur le site du conseil général de la Dordogne :

<https://perigorddurable.dordogne.fr/dialog/trophees-du-developpement-durable/proposal/vers-une-meilleure-pollinisation-du-chataignier>

# Discussion Générale

---



Dans le premier chapitre du livre *Pollination and Floral Ecology* (Willmer 2011), l'auteur appelle de ses vœux un renouvellement des travaux sur la pollinisation. La première partie de ma thèse illustre bien le programme de recherche ainsi esquissé :

*Increasingly these systems are being modeled, and our preconceptions [...] are being challenged. But the models are sometimes hampered by reliance on inadequate records, and understanding, of lower-visitor behaviors, and one of the most important issues for the immediate future is ensuring that the new generation of pollination ecologists understand the core subject material of floral biology and can measure and categorize pollination as distinct from mere visitation to feed into their models. We are in need of many and better quantitative studies of the effectiveness of visitors (for example, the average number of conspecific outcrossing pollen grains deposited on a stigma at an appropriate time by a given visitor in a single visit. Then we can properly understand plant and pollinator communities and pollination networks, and the effects of potential extinctions of lower visitors/pollinators on the communities of which they are a part. This book therefore hopes to provide in a single source a useful reference for all the aspects of floral biology and pollination interactions that need to be considered to give a real appreciation of these fascinating mutualisms.*

## UNE ETUDE GLOBALE DE LA POLLINISATION

Pendant ma thèse, je suis allé au delà du programme esquissé par Willmer (2011) en intégrant les outils de la génétique, seule façon d'aborder l'étude du système d'appariement. J'ai donc tenté d'avoir une approche globale de la pollinisation du châtaignier et des premières étapes de la formation des graines. J'ai étudié la production de pollen de cet arbre, le rôle des insectes dans sa pollinisation, les mécanismes prézygotiques qui impactent la probabilité de fécondation, et les mécanismes postzygotiques qui impactent la formation des graines. J'ai également exploré la manière la plus efficace de mesurer le succès de la pollinisation, un point clé pour ce travail. Les questions ont évolué depuis le début de la thèse, au fur et à mesure que nous découvrions l'écologie de la pollinisation du châtaignier, largement méconnue : comme prédit par Willmer (2011), nous avons dû plusieurs fois remettre en cause les idées reçues sur la pollinisation de cet arbre et ne pas en rester aux premières impressions. Un effort particulier a été fait pour mettre à l'épreuve nos propres résultats en reproduisant les expériences, surtout quand ces résultats allaient à l'encontre du discours établi.

### Un verger-forêt de châtaigniers

Nous avons travaillé principalement dans la collection INRAE de châtaignier (chapitre 1), qui présentait de nombreux avantages pour nos travaux : plusieurs espèces de châtaignier et leurs hybrides sont plantés au même endroit, facile d'accès, et la diversité génétique et phénotypique y est élevée, à la différence de la situation dans les vergers de production. De plus, la présence de clones obtenus par greffage a permis

de répliquer des observations et expériences sur un même fonds génétique. Ce site d'étude n'est ni un verger de production « moderne » (caractérisé par la présence de nombreuses copies clonales d'un très petit nombre de génotypes), ni une forêt issue de régénération naturelle où s'expriment pleinement les processus adaptatifs. Néanmoins, l'hétérogénéité du dispositif, consécutif à une forte mortalité, et la diversité des arbres, nous ont permis d'étudier des phénomènes caractéristiques de jeunes peuplements ouverts (autointerférence, nombreux coléoptères, plus fort taux de remplissage des variétés astaminés) et des phénomènes caractéristiques des forêts fermées (effet de la fermeture de la canopée, pollinisation par les mouches).

## Mode de pollinisation

Nous avons pu montrer que le châtaignier n'était pas pollinisé par le vent, mais par les insectes : nos travaux mettent en garde sur l'interprétation parfois trop rapide de certains syndromes floraux comme celui de la dispersion par le vent basé sur la production massive de petits grains de pollen. Ils mettent aussi en garde contre des explications qui semblent « consensuelles » de pollinisation mixte (vent et insectes), mais qui supposent des adaptations très différentes et probablement difficilement conciliables. Il en ressort que le châtaignier est le premier arbre entomophile en France, et de loin, jouant ainsi probablement un rôle écologique majeur, notamment pour l'entomofaune (sections 2.2. et 2.3.).

## Visiteur ou pollinisateur ?

Comme le souligne Willmer (2011), il est crucial, quand on s'intéresse aux mutualismes et antagonismes entre plantes à fleurs et insectes, de faire la différence entre insectes visiteurs et polliniseurs. Le plus bel exemple de cette différence est le cas des abeilles domestiques qui récupèrent de grandes quantités de pollen sur les chatons mâles de châtaignier, mais qui ne visitent pratiquement jamais ses fleurs femelles (sections 2.2. et 2.3.). Le service de pollinisation du châtaignier est donc assuré exclusivement par des insectes sauvages. C'est un nouvel exemple illustrant le fait que l'abeille domestique est rarement le pollinisateur le plus efficace et que le service de pollinisation dépend le plus souvent d'insectes sauvages (Garibaldi et al. 2013).

L'étape suivante pour confirmer le rôle d'un insecte dans la pollinisation d'une plante, comme souligné par Willmer (2011), consiste à étudier la proportion de pollen conspécifique qu'il transporte, témoignant de sa « fidélité » à la plante, puis la proportion d'allopollen (*outcrossed pollen*) permettant la fécondation croisée, un point déterminant dans la qualité du service de pollinisation. Dans le cas du châtaignier, nous avons étudié l'exemple du téléphore fauve, un coléoptère de la famille des cantharidés très abondant en verger. L'étude de la charge en pollen de 300 téléphores mâles et femelles a montré qu'il est très fidèle au châtaignier, puisqu'on n'a trouvé sur le corps d'insectes prélevés sur châtaignier que très peu de pollen

provenant d'autres espèces de plantes (section 2.4.). Par contre, en comparant les charges en pollen de téléphores capturés sur des arbres mâle-fertiles et mâle-stériles, nous avons pu déduire qu'ils transportaient très majoritairement de l'autopollen, probablement du fait de la durée prolongée de leur séjour sur chaque arbre et de leur faible mobilité, en particulier pour les femelles (section 2.4.).

Ces approches, qui ont permis de montrer que les abeilles ne sont que de simples visiteuses et que les téléphores transportent essentiellement de l'autopollen, peuvent sembler peu transposables. Elles ont en effet été rendues possibles uniquement parce que le châtaignier est à la fois monoïque et gynodioïque. Cela nous a permis de distinguer les visites des insectes aux fleurs mâles et aux fleurs femelles, et a rendu possible la comparaison des charges en pollen présentes sur les insectes en fonction de la production de pollen de l'arbre sur lequel ils étaient capturés. Chez d'autres plantes qui ne sont ni monoïques ni gynodioïques, on pourrait néanmoins vérifier si les insectes visitent bien les fleurs à la fois quand elles sont dans leur phase mâle et dans leur phase femelle, en cas de dichogamie, un trait floral très répandu (Bertin et Newman 1993). On pourrait de même émasculer certaines plantes puis comparer les charges en pollen des insectes rendant visite aux plantes témoins productrices de pollen et aux plantes émasculées qui n'en produisent plus.

Pour aboutir à encore plus de généréricité, il faudrait désormais développer une méthode moléculaire de caractérisation au niveau intraspécifique du mélange de pollen présent sur le corps des insectes. Identifier à l'échelle de l'individu (l'arbre dans notre cas) les précédentes plantes visitées par l'insecte grâce à la caractérisation de sa charge en pollen constituerait une avancée majeure. Poursuivre les développements du génotypage par séquençage de mélanges de pollen (section 2.4.) est donc une priorité. En utilisant des marqueurs ultra-polymorphes, il devrait être possible d'affecter chaque grain de pollen à un arbre plus simplement qu'avec l'approche utilisée précédemment par l'équipe japonaise, basée sur le génotypage de microsatellites de grains de pollen isolés (Hasegawa et al. 2015). En effet, la prouesse technique de l'équipe japonaise n'est pas compatible avec un débit important. Avec une approche de métabarcoding intraspécifique de la charge en pollen, il serait possible de caractériser en une seule opération (une seule réaction de PCR, et non autant que de grains de pollen étudiés) la composition du pool de pollen transporté par l'insecte : proportion de pollen hétérofécondant, nombre efficace et identité des donneurs de pollen. Cela permettrait de déterminer le nombre d'arbres visités et de les repérer sur le terrain, donnant ainsi des pistes pour reconstituer le chemin parcouru par chaque insecte étudié. Cette méthode devrait permettre à terme de caractériser la qualité du service de pollinisation des insectes, à condition de la coupler avec des observations montrant que le pollen est effectivement déposé sur les stigmates des fleurs, ce qui n'avait pas été fait dans l'étude japonaise mentionnée, limitant beaucoup son intérêt pour comparer l'efficacité des polliniseurs.

## Attirer les insectes au bon moment

Les croisements entre châtaigniers sont façonnés par la répartition des arbres dans l'espace, la phénologie, et les barrières interspécifiques. Nous avons trouvé des différences de phénologie entre espèces de châtaignier : le châtaignier chinois fleurit plus tôt que les châtaigniers japonais et européen (sections 1.2. et 1.4.). Le châtaignier est décrit comme duodichogame (Hasegawa et al. 2017), avec une alternance des périodes d'émission de pollen et de réceptivité femelle, ce qui limiterait l'autopollinisation. Avec les données phénologiques que j'ai assemblées, et qui sont pour l'instant sous exploitées, j'observe une grande hétérogénéité entre individus concernant la séquence florale. En conséquence, les autopollinisations ne sont que partiellement évitées. Alors comment expliquer cette cinétique de floraison particulière, avec deux pics de production de pollen ?

Nous avons proposé l'existence d'un mécanisme d'auto-imitation, les fleurs femelles ayant l'apparence des fleurs mâles, à la différence qu'elles sont dépourvues de récompense (pollen ou nectar) : elles seraient donc trompeuses vis-à-vis des insectes à la recherche de nourriture (sections 2.2. et 5.2.). Lors du premier pic de production de pollen, il y a énormément de fleurs mâles par rapport aux fleurs femelles, et ces dernières sont peu visitées par les insectes. Mais entre les deux pics et lors du second pic d'émission de pollen, il ne reste que quelques fleurs mâles présentes à proximité des fleurs femelles, et le nombre d'interactions entre les fleurs femelles et les insectes augmente fortement, notamment pour les diptères. L'hypothèse à tester serait que le premier pic mâle permettrait d'assurer la fécondité mâle de l'arbre, tandis que le second pic de floraison mâle permettrait d'assurer la pollinisation des ovules et la formation des graines. La longue période de réceptivité femelle à l'échelle des arbres, qui reste encore à clarifier, serait la somme des périodes de réceptivité à l'échelle de chacun des 6-8 styles des fleurs, de chacune des trois fleurs femelles au sein d'une inflorescence, avec une fleur centrale plus précoce que les fleurs latérales, et des différentes inflorescences d'un arbre, constituant la signature d'une adaptation à un mécanisme de pollinisation rare et incertain. La différence de succès de pollinisation des arbres mâle-stériles et des arbres mâle-fertiles, due à l'autointerférence, pourrait être accrue par une probabilité de visite plus élevée des fleurs femelles des arbres mâle-stériles par les insectes, liée à un mécanisme de visites des fleurs fréquence-dépendant. En effet, chez ces arbres mâle-stériles, les seules structures évoquant des étamines et leurs récompenses associées sont représentées par les fleurs femelles. Au contraire, chez les arbres mâle-fertiles, ces fleurs femelles seraient perdues dans la masse des fleurs mâles pendant le premier pic de production de pollen.

## Choix par les insectes des arbres visités

Comment les insectes choisissent-ils les arbres qu'ils visitent ? Le signal pourrait être visuel, favorisé par la floraison massive du châtaignier. Les arbres pourraient être choisis par les insectes sur un critère de

taille et d'abondance de la floraison, par exemple. C'est ce qui semble ressortir des résultats de la section 4.3., où la taille de l'arbre semble associée à un meilleur succès de la pollinisation. Si la pollinisation était passive, effectuée par du pollen transporté par le vent, une telle relation serait difficilement explicable. Nous n'avons pas testé à ce jour d'autres hypothèses liées au contexte propre à chaque arbre. En effet, l'aptitude à attirer des insectes pourrait être plutôt liée à ce qui démarque un arbre de ses voisins, et qui fera que l'arbre sera choisi de préférence parmi d'autres par les insectes : c'est la théorie de la *plant apparency*, développée par nos collègues de Biogeco travaillant sur le choix des arbres par les insectes herbivores (Castagneyrol et al. 2013). Ils ont montré que quand les arbres se démarquent de leurs voisins par leur taille, les dégâts par les insectes herbivores sont plus forts, et que ces dégâts diminuent quand les arbres cibles sont associés à des arbres plus grands d'autres espèces non susceptibles (cas de résistance par association). On pourrait ainsi imaginer que pour les insectes pollinisateurs, plus les arbres se démarquent de leurs voisins, plus ils sont visibles et plus ils augmentent leurs chances d'être visités.

Avec l'accessibilité des nouvelles technologies type drones, il devient possible de cartographier un peuplement d'arbres et de le modéliser par des approches de photogrammétrie. Il serait fort souhaitable, vu l'investissement déjà réalisé, de caractériser ainsi la collection INRAE de châtaignier, comme base pour la compréhension des mouvements d'insectes, en lien avec l'utilisation d'approches de metabarcoding pour reconstruire leurs parcours effectifs au sein du verger. Ainsi, on pourrait développer une meilleure compréhension des mouvements des insectes pollinisateurs et modéliser leurs conséquences sur le succès de la pollinisation et sur le rendement. Avec les données récoltées dans la collection INRAE, nous pourrions alors modéliser le houppier des arbres et étudier le lien entre leur apparence comparée aux arbres voisins et le succès de la pollinisation des fleurs femelles ainsi que le succès à exporter du pollen, dont dépend leur fécondité mâle. En effet, un des atouts les plus importants du modèle bayésien développé par Etienne Klein, et que j'ai pu utiliser dans cette thèse (section 4.3.), c'est de pouvoir estimer simultanément l'effet de covariables modulant la fécondité mâle et le succès de l'appariement femelle.

Un autre signal pourrait attirer les insectes, c'est l'odeur des châtaigniers. Les fleurs dégagent une forte odeur suave diversement perçue, comme l'illustre par exemple un court texte du Marquis de Sade intitulé *La fleur de châtaignier* (Sade 1788). Nous n'avons pas étudié les variations d'odeurs entre arbres mais avons pu constater sur le terrain des ressemblances évidentes d'odeurs entre ramets d'un même clone. On peut tout à fait concevoir qu'un arbre puisse se différencier des arbres qui l'entourent par l'abondance ou la composition du cocktail de molécules odorantes qu'il émet. Ainsi, en plus d'étudier l'apparence visuelle des arbres, il faudrait étudier leur apparence olfactive.

## Coléoptères ou diptères ?

Les résultats recueillis en forêt, dans la vallée des Aldudes au Pays Basque (section 2.5.), soulèvent de nouvelles interrogations sur les principaux agents de la pollinisation : nous y avons compté un faible nombre d'insectes pendant la floraison, et ceux-ci étaient quasiment tous des diptères. Les taux de remplissage des bogues mesurés à l'automne dans ce site sont assez élevés et proches des taux mesurés dans les vergers les mieux pollinisés. Pourtant, dans ces forêts fermées, aucun téléphore fauve n'a été observé. Nous savons désormais que les téléphores fauves sont nombreux en verger, qu'ils restent longtemps sur les arbres, qu'ils visitent très fréquemment les fleurs mâles et femelles, et qu'ils transportent beaucoup d'autopollen. Nous savons aussi grâce aux expériences d'émasculation locale que ce sont des mécanismes opérant à l'échelle d'une seule branche, c'est-à-dire à une échelle correspondant bien aux déplacements des téléphores et d'autres coléoptères aux comportements semblables, qui engendrent l'auto-inférence et qui diminuent le taux de remplissage des bogues (section 3.5.). Il serait donc souhaitable de mieux étudier le rôle des diptères dans la pollinisation du châtaignier, en s'inspirant de ce que nous avons fait sur le téléphore fauve (section 2.4.), afin de comparer l'efficacité de pollinisation des diptères avec celle des coléoptères. Même si les interactions des fleurs femelles avec les mouches sont moins fréquentes, elles pourraient être plus déterminantes si ces mouches transportent une plus grande proportion de pollen compatible. Cela confirmerait l'hypothèse de Zhang et al. (2019) selon lesquels le châtaignier serait sapromyophile, c'est-à-dire pollinisé par les mouches attirées par l'odeur forte émise par les fleurs de ces arbres. Comme les diptères et les coléoptères ne semblent pas répondre de la même manière aux conditions de l'environnement, et notamment à la fermeture de la canopée, il serait important de tester si le taux de remplissage diminue quand la densité des arbres augmente.

## L'autointerférence plutôt que la limitation par le pollen

Nous avons dû remiser certaines de nos idées préconçues, comme prédit par Willmer (2011). En effet, la découverte de l'autointerférence chez le châtaignier fût une surprise. Au départ, nous pensions que la quantité de pollen arrivant sur une plante pourrait être limitante pour sa production de fruits, mais cela s'est révélé inexact. En effet, ce n'est pas uniquement la quantité de pollen qu'il faut considérer, mais aussi sa qualité. Ce qui est déterminant, c'est la composition du nuage pollinique, notamment la proportion d'autopollen. Plus la proportion de pollen hétérofécundant est élevée, plus la probabilité de pollinisation sera forte. Nos résultats montrent aussi que la composition du nuage pollinique joue au-delà de la seule proportion d'autopollen : en particulier, sa composition spécifique est déterminante, le pollen conspécifique étant presque toujours avantagé (sections 4.2. et 4.3.). Les châtaigniers hybrides constituent une exception, puisque nous avons montré que leurs fleurs femelles ont plus d'affinité pour le pollen d'une des deux espèces parentales, le châtaignier japonais (section 4.3.).

Nous avons mis en évidence en verger une diminution drastique du taux de remplissage des bogues lié à un mécanisme d'autointerférence aboutissant à l'avortement des ovules autofécondés (sections 3.5. et 4.3.). Chez les plantes hermaphrodites, des interférences entre les fonctions mâles et femelles peuvent conduire à la perte de gamètes et avoir ainsi des conséquences négatives sur leur fitness. Pour Barrett (2002), ce mécanisme illustre l'antagonisme entre sélection naturelle et sexuelle. Curieusement, la perte de pollen (*pollen discounting*) a été plus souvent étudiée que la perte d'ovules (*ovule discounting*) (Barrett 2002). Mais ceci ne signifie pas que la perte d'ovules consécutive à l'autopollinisation soit un phénomène rare : une revue systématique des travaux d'émasculation permettrait de mesurer sa prévalence chez les espèces allogames, en comptabilisant les espèces chez lesquelles l'émasculation améliore le succès de la pollinisation, comme constaté chez le châtaignier.

### Stérilité mâle et gynodioecie

Les variétés de châtaignier ont été classées, dans la littérature arboricole, selon une approche plus typologique que fonctionnelle, en fonction de la longueur des filaments de leurs étamines. Nous avons tout d'abord découvert que cette diversité reflétait l'existence d'un système de stérilité mâle cytoplasmique avec son système de restauration de la fertilité (section 3.2.). Dans le genre *Castanea*, ce polymorphisme sexuel semble présent naturellement uniquement chez le châtaignier européen (section 3.2.) Cette classification des arbres basée sur le type de fleurs s'est révélée être étonnamment informative, d'après les résultats des analyses de paternité confortés par le modèle bayésien de la pollinisation (section 4.3.). La présence d'individus mâle-stériles dans les populations naturelles fait du châtaignier une espèce gynodioïque. Cette évolution reflète l'intense pression de sélection de l'interférence sexuelle contre les individus bisexués et l'avantage conséquent à y échapper pour les mâle-stériles (section 3.5.), facilitée par l'hérédité maternelle de la stérilité.

Un atout important de notre modèle biologique, le châtaignier, c'est de pouvoir contraster ce qui se passe chez des arbres produisant ou non du pollen. Nous l'avons exploité à plusieurs reprises, par exemple pour déterminer si les insectes visitaient le châtaignier en fleur pour son nectar ou pour son pollen (section 2.2.). Cet atout pourrait aussi être exploité pour mieux comprendre les conséquences de ces visites sur la fécondité mâle et sur le succès de l'appariement. Pour les arbres mâle-fertiles, plus ils sont visités par les insectes, plus leur fécondité mâle devrait être important. De même, pour les arbres mâle-stériles, plus les arbres reçoivent de visites, plus la probabilité de fécondation (succès de l'appariement) devrait être forte, avec un plateau correspondant à une pollinisation maximale (dans certains vergers, pratiquement toutes les bogues contiennent trois fruits développés). Dans le cas des arbres mâle-fertiles, toutefois, c'est plus compliqué, selon le comportement des insectes et la quantité d'auto-pollen qu'ils sont susceptibles d'apporter aux fleurs femelles. Les expériences d'émasculation de branches que j'ai conduites indiquent

en effet que ce sont les chatons mâles voisins des fleurs femelles qui sont principalement responsables de cette auto-pollinisation et de la perte d'ovules associée (section 3.5.). Ce sont donc les mouvements des insectes précédant les visites aux fleurs femelles qu'il convient d'étudier pour déterminer la qualité de leur service de pollinisation, ce que nous avons commencé à faire au printemps 2021.

## La qualité du pollen, clé du succès de la pollinisation

Suivant leurs comportements, les insectes pollinisateurs ne transportent pas le même pollen, avec des conséquences importantes pour le succès de la pollinisation. Ainsi, les insectes peuvent différer pour la proportion d'auto-pollen qu'ils vont déposer sur les fleurs (sections 2.2., 2.3., 2.4. et 2.5.). Sur des arbres mâle-fertiles, les télaphores faunes, les insectes les plus abondants dans les vergers étudiés, transporteraient environ 90 à 95% d'autopollen, engendrant des risques d'autopollinisation très élevés. La qualité du pollen transporté par les insectes a en effet un fort impact sur le succès de la pollinisation du châtaignier : lorsque les insectes pollinisateurs déposent beaucoup d'autopollen, un fort taux d'avortement des ovules est estimé (sections 3.5. et 4.3.). Dans notre site d'étude principal, où les insectes visiteurs sont nombreux, c'est d'ailleurs uniquement la qualité du pollen reçu, et non la quantité, qui permet d'expliquer le succès de la pollinisation (section 4.3.). Ainsi, les châtaigniers mâle-stériles évitent l'effet négatif de l'auto-interférence lié à l'auto-pollinisation, et produisent nettement plus de fruits pleins que les châtaigniers mâle-fertiles. Cet « avantage femelle », lié à l'évitement de l'auto-pollinisation, pourrait être à l'origine de la gynodioécie du châtaignier européen (section 3.5.).

## Le rôle déterminant de l'environnement

L'environnement entourant les vergers joue aussi un rôle important dans la pollinisation des fruits. De cet environnement dépendra l'abondance et la nature des arbres et insectes pollinisateurs (*pollenizers* et *pollinators*) qui déterminent conjointement le succès de la pollinisation. En particulier, plus cet environnement offrira de ressources et de sites de reproduction aux insectes pollinisateurs, plus ils seront abondants et meilleure sera la qualité du service de pollinisation qu'ils fournissent. Nous n'avons pas exploré l'effet de l'environnement et des itinéraires cultureaux sur l'abondance des insectes pollinisateurs : c'est un sujet qu'il serait souhaitable de traiter. Par contre, nous avons mis en évidence un problème majeur d'insuffisance de donneurs de pollen dans les vergers (*pollenizer limitation*, cf. section 4.2.). Celui-ci pourrait en principe être en partie compensé par des donneurs de pollen extérieurs aux vergers. Ainsi, nous avons pour la première fois mis en évidence le rôle des forêts de châtaigniers européens « sauvages » dans la pollinisation des vergers, et nous avons pu quantifier leur impact : il est assez modeste, puisqu'ils n'ont pollinisé que 17 % des fruits récoltés dans les vergers étudiés (4.2.). Le pollen peut en principe aussi venir d'anciens vergers abandonnés, laissés à l'abandon avec l'arrivée de la culture des céréales, ou d'arbres greffés autour des fermes par les habitants, afin d'être faciles d'accès, avec des greffons prélevés sur un

arbre qui produisait des fruits d'intérêt. Cette pratique, très courante avec les arbres fruitiers, a permis la propagation de variétés de châtaignier sélectionnées localement (Teresa Barreneche, communication personnelle). Mais ce qui est le plus étonnant, c'est la forte proportion de fruits attribués à des arbres extérieurs aux vergers étudiés mais appartenant à d'autres espèces que le châtaignier européen : ceux-ci ont engendré environ 30 % des fruits. Ces arbres appartiennent soit à des variétés hybrides connues, soit correspondent à des génotypes hybrides ou asiatiques que nous n'avons pas dans la collection de châtaignier INRAE qui nous sert de référence. En résumé, la moitié environ des fruits sont formés avec du pollen provenant de l'extérieur des vergers, mais avec le déclin des châtaigniers forestiers et la perte de biodiversité (des insectes pollinisateurs), nous pouvons nous interroger sur la pérennité de ce service de pollinisation, qui de toute manière ne peut compenser qu'en partie la trop faible diversité variétale des vergers.

### Un écosystème châtaignier en cours de mutation

Le châtaignier européen a représenté une culture majeure des pays du Sud de l'Europe au 19<sup>ème</sup> siècle, au point qu'on évoque souvent une véritable « civilisation du châtaignier » (Pitte 1986). Les premiers dégâts en France liés à la maladie de l'encre sont signalés en 1860 (Schad et al. 1952), et ceux liés au chancre de l'écorce sont apparus 100 ans plus tard (Rigling et Prospero 2018). Ces deux maladies d'origine asiatique provoquent dès lors de nombreux dégâts dans les forêts et les vergers de châtaignier européens et la production de châtaignes diminue fortement. Au 19<sup>ème</sup> siècle, la culture des céréales, et du blé notamment, révolutionne l'agriculture qui est maintenant basée sur le labour. Ce fut un coup dur pour la castanéiculture, qui a régressé sous l'action conjointe de maladies émergentes et de la révolution agraire. Enfin, le cynips du châtaignier (*Dryocosmus kuriphilus*) est signalé en 2007 en France. Ce micro-hyménoptère d'origine asiatique pond dans les bourgeons du châtaignier pendant la saison de végétation, et les larves en se développant provoquent l'apparition de galles au printemps suivant. Les rameaux des plants infestés poussent moins, sont déformés, et la production de fruits des arbres s'effondre. Une solution de lutte biologique a été proposée, et des lâchers massifs de *Torymus sinensis*, un micro-hyménoptère parasitoïde du cynips, lui aussi d'origine asiatique, sont désormais pratiqués avec succès.

Pour disposer de variétés tolérantes aux maladies du chancre et de l'encre, en provenance d'Asie, des châtaigniers asiatiques ont été introduits, notamment le châtaignier japonais, assez résistant à ces maladies. On peut citer par exemple les travaux de Germain Lafitte, un Basque fondateur des pépinières Lafitte, qui dès le début des années 1920 se lance dans la sélection de châtaigniers japonais adapté aux conditions environnementales du Pays-Basque et sélectionne trois variétés de *C. crenata* qui devinrent célèbres, 'Ipharra', 'Ederra' et 'Marki'. Ou le programme de sélection de variétés de châtaignier menés par l'INRA dès la fin de la seconde guerre mondiale à la station de Brive d'amélioration du châtaignier, avant d'être

transféré à Bordeaux dans les années 1970, qui se basait sur des croisements avec les châtaigniers japonais, et plus récemment chinois (fin des années 80). Ces variétés hybrides représentent la majorité des vergers modernes du sud-ouest de la France, tandis que les vergers traditionnels du sud-est reposent toujours sur des variétés de châtaignier européen bien adaptées aux conditions climatiques locales. Dans le sud-ouest, les deux variétés ‘Marigoule’ et ‘Bouche de Bétizac’ représentent la quasi-totalité des vergers. Par exemple, dans le Limousin, 70 % des vergers sont plantés avec ‘Marigoule’, et 10 % avec ‘Bouche de Bétizac’ (Ginestet 2020). La diversité génétique des vergers est donc très faible, d'autant plus que seuls deux porte-greffes eux-mêmes hybrides, résistants à la maladie de l'encre, sont utilisés pour tous les plants greffés : ‘Maraval’ et ‘Marsol’. Si ces résistances sont contournées, ou si de nouvelles maladies arrivent auxquelles ces clones seraient sensibles, les dégâts pourraient être conséquents.

Ce qui est remarquable, c'est de noter, dans l'exemple du châtaignier résumé ci-dessus, à quel point les invasions biologiques ont façonné les agrosystèmes puis les forêts en France et dans toute l'Europe. Les étapes ont été les suivantes : arrivée de pathogènes exotiques attaquant les vergers et les forêts ; introduction de matériel exotique résistant de la même zone géographique que les pathogènes ; introduction des ennemis naturels exotiques également de la même région, pour la lutte biologique ; contamination génétique des forêts de châtaignier européen par le pool génétique des espèces asiatiques de châtaignier (Alcaide 2021), facilitée par des barrières asymétriques mises en évidence dans le chapitre 4 et par la plus grande résistance des châtaigniers asiatiques aux maladies.

### Des services écosystémiques qui deviennent caducs

Une conséquence inattendue, c'est que dans les vergers constitués d'hybrides, le service d'assurance de pollinisation fourni par les populations sauvages ou champêtres de l'espèce autochtone, le châtaignier européen, se retrouve dévalué. C'est la conséquence de la barrière existant chez les hybrides de châtaignier européen × japonais vis-à-vis des croisements en retour avec le châtaignier européen (section 4.3.). Le service écosystémique de pollinisation fourni par les insectes pourrait aussi être dévalué en sélectionnant des variétés de châtaignier auto-compatibles. L'attente est là, puisque certains pépiniéristes et des jardineries n'hésitent pas à mettre en avant l'auto-compatibilité des variétés qu'ils commercialisent (sections 5.2. et 5.3.). Même si c'est de la désinformation, cela ne signifie pas que c'est impossible de sélectionner des variétés partiellement auto-compatibles. Nous avons trouvé dans collection de châtaignier INRAE une variété (sur 21 testées) qui s'autofécondait à un taux bien plus élevé que les autres (section 4.3.), et nos collègues espagnols nous ont indiqué qu'ils avaient entrepris de rechercher des variétés présentant cette caractéristique d'auto-compatibilité. Ainsi, on voit que deux services écosystémiques rendus par la biodiversité naturelle (la pollinisation par des variétés donneuses de pollen, et les insectes pollinisateurs sauvages) pourraient être rendus obsolètes par l'évolution de l'agriculture.

C'est une tendance générale, qu'il serait d'ailleurs intéressant de mieux documenter. Par exemple, concernant la pollinisation, il existe des travaux abordant la dépendance des plantes cultivées ou sauvages aux polliniseurs (Reilly et al. 2020 ; Ollerton et al. 2011 ; Rodger et al. 2021), mais la comparaison des deux est rarement abordée : du coup il est difficile d'évaluer dans quelle mesure les plantes cultivées sont moins dépendantes des polliniseurs que les plantes sauvages. Pourtant, de nombreux exemples existent, à commencer par la vigne, initialement dioïque et pollinisée par les insectes, et devenue hermaphrodite et auto-fertile suite à la domestication (Zito et al. 2018). Cela illustre une difficulté du concept de service écosystémique rarement mise en avant : le service lui-même peut devenir caduc suite aux efforts de la recherche en agriculture. Pour développer l'agroécologie, il faudra aborder cette réalité et réorienter les recherches.

## PISTES DE RECHERCHE POUR AMELIORER LA POLLINISATION DU CHATAIGNIER EN VERGER

### Et le rendement ?

Durant ces travaux de thèse, j'ai abordé une composante du rendement, le succès de l'appariement femelle, mais pas directement le rendement lui-même (la production de fruits). Pour mesurer le succès de l'appariement femelle, qui reflète largement le succès de la pollinisation, de nombreuses métriques sont envisageables : proportion de graines pleines par fruit, proportion de fruits développés par inflorescence, proportion de graines viables produites par fleur ou par inflorescence, etc. L'objectif est de choisir une mesure qui dépende le plus directement possible du pollen apporté, et donc qui soit le moins possible impactée par d'autres facteurs comme les ressources en eau et en nutriments. Il n'existe pas à notre connaissance de travaux de référence approfondis indiquant une démarche à suivre pour mesurer efficacement le succès de l'appariement. Dans le cas du châtaignier, nous avons choisi de ne compter que les bogues contenant un, deux ou trois fruits. Après avoir calculé un taux de remplissage corrigé par une loi binomiale prenant en compte les bogues vides non comptabilisées, nous obtenons une mesure simple et fiable du taux de remplissage pouvant être mesurée rapidement sur un grand nombre d'arbres (section 3.3.). Tout semble indiquer que cette mesure du taux de remplissage caractérise de façon assez directe le succès de l'appariement : nous avons en effet vérifié que les événements aboutissant au développement des fruits étaient largement indépendants et que cette mesure ne semblait pas dépendre des ressources de la plante mère (section 3.4.).

Dans la collection INRAE, nous n'avons pas mis en évidence de différences de taux de remplissage entre les espèces de châtaignier (section 3.5.). Par contre, les fruits produits par les variétés male-stériles étaient

à la fois mieux pollinisés mais aussi plus légers que les fruits produits par les variétés male-fertiles (section 3.5.). Il y a donc bien une forme de compensation entre nombre de fruits et leur poids, par effet de compétition, y compris intra-bogue (section 3.4.). Il semble néanmoins clair qu'un verger mal pollinisé ne sera jamais aussi productif qu'un verger bien pollinisé, même si les fruits sont légèrement plus légers dans ce dernier. Cette question du rendement est essentielle pour convaincre les producteurs d'améliorer la pollinisation de leurs vergers. Une solution serait de mettre en place avec eux un programme de science participative : en les aidant à réaliser dans leur verger des mesures du rendement et des mesures de taux de remplissage des bogues, il sera possible d'estimer à quel point la production dépend de la pollinisation. En se focalisant sur une ou deux variétés phares (par exemple une variété mâle-stérile et une variété mâle-fertile), on pourra mieux contrôler une des sources de variation du succès de la pollinisation et faciliter ainsi les interprétations des résultats. Cela permettrait d'avoir rapidement un état des lieux du service de pollinisation des vergers de production et de combattre les mythes et les désinformations qui circulent sur la pollinisation du châtaignier (section 5.1.).

La variété de châtaignier utilisée comme mère a un impact sur le poids des fruits : c'est une des bases de la sélection des variétés. Qu'en est-il des pères ? Pour répondre à cette question, il faudrait étudier la relation entre le poids des fruits et l'origine du pollen qui a fécondé les graines. Cet effet est appelé xenia, un nom donné par Focke (1881) pour évoquer l'effet de la source de pollen sur le poids de l'endosperme de maïs. Cet effet a été retrouvé sur le châtaignier par McKay et Crane (1939). Il sera possible de poursuivre ce travail commencé il y a plus de 80 ans sur châtaignier car tout est prêt pour les analyses. Les fruits utilisés pour les analyses de paternité (sections 4.2. et 4.3.) ont tous été pesés, et leur place dans la bogue, qui joue sur leur poids (section 3.4.), a été notée. Ce travail pourrait aider à choisir des variétés donneuses de pollen apportant un double bénéfice au producteur : une bonne pollinisation (donc plus de fruits) et des fruits plus gros, par effet xenia.

## L'effet de la densité sur la pollinisation

Avant de pouvoir proposer aux producteurs des outils opérationnels pour optimiser la pollinisation en verger, plusieurs études restent à conduire. Premièrement il conviendrait de déterminer l'effet de la densité des arbres sur le succès de la pollinisation : à ce jour, nous n'avons pas pris en compte de caractéristiques extrinsèques aux arbres dans la modélisation du succès de la pollinisation (section 4.3.). Or la comparaison avec ce qui se passe en forêt incite à regarder plus précisément ces effets de l'environnement. Deuxièmement, il conviendrait d'identifier précisément les insectes impliqués dans la pollinisation, en continuité avec les travaux initiés pendant ma thèse (section 2.5.). Enfin, il serait souhaitable d'utiliser la modélisation pour concevoir et gérer de nouveaux vergers plus durables et plus productifs, en jouant sur leur composition (variétés choisies et leur disposition) ainsi que sur les

techniques culturales favorisant les insectes polliniseurs, valorisant ainsi les résultats et le modèle bayésien développé (section 4.3.).

Une seule hypothèse était mise en avant par la profession pour expliquer la faible production de fruits dans ces vieux vergers fermés : une diminution du nombre de fleurs, faute de lumière. Mais d'autres explications sont envisageables. Lorsque le milieu se ferme, les communautés d'insectes polliniseurs changent, et la pollinisation pourrait aussi être impactée. Il faudrait donc étudier l'impact de la fermeture du milieu sur la communauté d'insectes polliniseurs et sur le succès de la pollinisation. Les données récoltées dans la collection INRAE de châtaignier pourraient permettre de répondre à cette question. Pour évaluer la fermeture du milieu, il faut mesurer la surface occupée par les canopées des arbres autour de l'arbre étudié à différentes échelles : ce travail est en cours.

## Des vergers virtuels

Une fois amélioré, en introduisant par exemple l'effet de la densité ou celui de l'apparence des plantes sur la probabilité de pollinisation, le modèle spatialement explicite présenté dans la section 4.3. pourra être utilisé pour prédire le succès de pollinisation de vergers réels ou virtuels. Dans le premier cas, nous pourrions vérifier si on peut prédire correctement les taux de remplissage observés, d'une année sur l'autre (nous avons acquis des données génétiques sur des fruits récoltés en 2018 et 2019 dans la collection de châtaignier INRAE, mais seules les données de 2018 ont été analysées), et d'un verger à un autre. Dans le second cas, nous pourrions soit partir de vergers réels mais en les modifiant pour simuler l'introduction de nouvelles variétés donneuses de pollen, soit concevoir *in silico* de nouveaux vergers. L'idée est d'explorer des vergers qui diffèrent par le nombre de variétés présentes, leurs proportions relatives, et leur distribution spatiale dans le verger, afin de définir les proportions et configurations optimales pour la pollinisation. Ceci permettra d'étudier la proportion maximale de variétés mâle-stériles (section 3.5.), souvent plus productives que les variétés bisexuées, qui peuvent être utilisées sans compromettre la pollinisation du verger dans son ensemble. Je m'attends à ce que la solution retenue soit un compromis associant la gestion du verger, les problématiques de récolte et la fonction de pollinisation. Pour l'instant, un verger avec un grand nombre de variétés est plutôt vu comme un handicap au moment des récoltes, car les différentes variétés doivent être ramassées séparément, un point qu'il faudra prendre en considération si on espère faire évoluer les choses.

Pour que les variétés male-fertiles soient correctement pollinisées et que le nombre d'ovules avortés reste relativement faible, il faut que l'autopollen incompatible soit dilué par du pollen compatible. Mais à quel point ? Comment faire pour calculer le pourcentage d'arbres donneurs de pollen qui doivent être plantés dans le verger ? Une piste serait d'utiliser des approches de modélisation en s'inspirant de travaux développés pour étudier la contamination par les OGM (Lavigne et al. 2008). Ces auteurs ont étudié la

pollution du nuage de pollen de culture de maïs non-OGM par du pollen de maïs OGM. Ils estiment le pourcentage de graines non-OGM pollinisées par du maïs OGM, afin de limiter au maximum ces contaminations. Dans le cas de la conception de vergers de châtaignier, c'est la logique contraire qui est recherchée : il faut qu'il y ait suffisamment de pollen compatible dans le nuage d'autopollen pour qu'une majorité des graines puissent être fécondées.

### Un diagnostic pollinisation et des solutions pratiques

Une autre perspective serait de proposer un service, sous forme de « diagnostic pollinisation en verger », assorti ensuite, en cas de problème avéré de pollinisation, de solutions techniques pour augmenter le nombre de donneurs de pollen dans les vergers. Quand les vergers sont déjà âgés, les sur-greffages pour augmenter le nombre de donneurs de pollen sont compliqués à gérer. Augmenter la diversité dans des vergers monovariétaux devra sans doute passer par la coupe et le remplacement par des variétés donneuses de pollen d'une partie des arbres des variétés productrices de fruit. C'est d'autant plus difficile que le Label Rouge « Marron », qui concerne environ 200 producteurs en France, surtout dans le sud-ouest, ne reconnaît que trois variétés productrices ('Bouche de Bétizac', 'Marigoule' et 'Bournette'), les châtaignes des autres variétés étant déclassées.

## CONCLUSION

Pendant cette thèse, j'ai étudié les mécanismes de la reproduction du châtaignier, de la pollinisation des fleurs femelles par les insectes à la formation des fruits. D'un point de vue académique, grâce à de nouveaux développements méthodologiques, cette thèse a permis d'acquérir des résultats originaux : le châtaignier européen est une espèce gynodioïque et son succès de pollinisation est façonné par des barrières prézygotiques et postzygotiques. L'espèce s'est révélée être un excellent modèle d'étude, permettant d'aborder des questions d'intérêt général sur la distinction entre insecte visiteur et pollinisateur, la nécessité de plus prendre en compte la qualité du pollen délivré par les insectes, l'importance réelle de l'autointerférence chez les plantes, et l'identification *in situ* de traits ou de caractéristiques de l'environnement affectant la probabilité de formation des fruits. J'ai pu mettre en évidence la valeur importante du service de pollinisation assuré par les insectes polliniseurs sauvages et par les châtaigniers présents dans les paysages autour des vergers de production. J'espère que cette thèse marquera le début d'un travail de conception de vergers productifs, durables et respectueux de l'environnement, mettant pleinement à profit la biodiversité dans son fonctionnement, en phase avec les objectifs de l'agroécologie.

## RÉFÉRENCES

- Barrett S (2002) Sexual interference of the floral kind. *Heredity* 88:154–9. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800020>
- Bertin RI, Newman CM (1993) Dichogamy in angiosperms. *BotRev* 59:112–152. <https://doi.org/10.1007/BF02856676>
- Castagneyrol B, Giffard B, Péré C, Jactel H (2013) Plant apparency, an overlooked driver of associational resistance to insect herbivory. *J Ecol* 101:418–429. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12055>
- Focke WO (1881) Die Pflanzen-Mischlinge: Ein Beitrag zur Biologie der Gewächse. Gebr. Borntraeger
- Garibaldi LA, Steffan-Dewenter I, Winfree R, et al (2013) Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* 339:1608–1611. <https://doi.org/10.1126/science.1230200>
- Ginestet A (2020) Dix fois plus de vergers de châtaigniers en dix ans en Haute-Vienne, selon les producteurs du département. France Bleu Limousin
- Hasegawa Y, Suyama Y, Seiwa K (2015) Variation in pollen-donor composition among pollinators in an entomophilous tree species, *Castanea crenata*, revealed by single-pollen genotyping. *PLoS ONE* 10:e0120393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120393>
- Hasegawa Y, Suyama Y, Seiwa K (2017) Flowering phenology of a duodichogamous self-incompatible tree species, *Castanea crenata*. *Jpn J Ecol* 67:31–39. [https://doi.org/10.18960/seitai.67.1\\_31](https://doi.org/10.18960/seitai.67.1_31)
- Lavigne C, Klein EK, Mari J-F, et al (2008) How do genetically modified (GM) crops contribute to background levels of GM pollen in an agricultural landscape? *J Appl Ecol* 45:1104–1113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01504.x>
- McKay JW, Crane HL (1939) Xenia in the chestnut. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.89.2311.348>
- Ollerton J, Winfree R, Tarrant S (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120:321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
- Pitte J-R (1986) Terres de Castanide : Hommes et paysages du Châtaignier de l'Antiquité à nos jours. Fayard
- Reilly JR, Artz DR, Biddinger D, et al (2020) Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators. *Proc R Soc B* 287:20200922. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0922>
- Rigling D, Prospero S (2018) *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Molecular Plant Pathology* 19:7–20. <https://doi.org/10.1111/mpp.12542>
- Rodger JG, Bennett JM, Razanajatovo M, et al (2021) Widespread vulnerability of flowering plant seed production to pollinator declines. *Sci Adv* 7:eabd3524. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd3524>
- Sade DAF de (1788) La fleur de châtaignier. In: Heine M, Kra S (1926) Historiettes, Contes et Fabliaux. Paris
- Schad C, Solignat G, Grenet J, Venot P (1952) Recherches sur le châtaignier à la station de Brive. *Ann Amelior Plantes* 3:376–458
- Willmer P (2011) Pollination and floral ecology. *Pollination and Floral Ecology*. <https://doi.org/10.1515/9781400838943>
- Zhang X, Ji Y, Zhang Y, et al (2019) Molecular analysis of semen-like odor emitted by chestnut flowers using neutral desorption extractive atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 411:4103–4112. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1487-7>
- Zito P, Serraino F, Carimi F, et al (2018) Inflorescence-visiting insects of a functionally dioecious wild grapevine (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*). *Genet Resour Crop Evol* 65:1329–1335. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0616-7>



## Annexes

---



# Supplementary 1: High throughput cost-effective CTAB DNA isolation protocol for nuts and leaves of chestnut trees

## Materials

### Reagents

- Liquid nitrogen
- CTAB, also known as hexadecyltrimethyl ammonium bromide (SIGMA ref: H6269-250G)
- EDTA, 0,5M pH8 (SIGMA ref: 03690-100ML)
- Tris HCl, 1M pH8 (SIGMA réf : T2694-1L)
- NaCl, 5M, SIGMA réf : S5150-1L
- PVP, also known as polyvinylpyrrolidone (SIGMA ref: PVP-40-100G)
- $\beta$ -mercaptoethanol (SIGMA réf : M3148-25ML)
- Rnase A (INVITROGEN ref: 12091-039)
- Proteinase K (SIGMA ref: P6556-100MG)
- PVPP, also known as polyvinylpolypyrrolidone (SIGMA ref: P6755-100G)
- Chloroforme (VWR ref: 22711.290)
- Isoamylalcool (VWR ref: 20796.298)
- Isopropanol (VWR ref: 20842.298)
- Absolute Ethanol (VWR ref: 20821.296)
- 70 % Ethanol (VWR ref: 83801.360)
- Autoclaved MilliQ H<sub>2</sub>O

### Equipment

- SPEC CertiPrep 20210 Geno / Grinder
- Aluminium rack for 96-well plate
- 1 channel micropipettes: P200, P1000 and 8 channel micropipettes: P300, P1250
- Micropipette tips to fit micropipette
- Manual of electronic dispenser
- Combitips to fit dispenser
- Microcentrifuge capable of spinning 2 plates of 96x1.2ml tubes at 6200rpm at 4°C
- Benchtop incubated orbital shaker
- 96-well plate with 1.2mL tubes
- Fume hood
- -20°C and -80°C freezers

### Important points before starting

- CTAB lysis buffer is stored at room temperature.
- 5M NaCl solution is stored at 4°C.
- 70 % ethanol, absolute ethanol and isopropanol are stored at -20°C.
- All centrifuge steps are carried out at 4°C in a plate microcentrifuge.

## Things to do before starting

### Prepare plant tissue

- 1) Add a first 4mm stainless steel grinding ball into each 1.2ml tube of a 96 plate samples plate.
- 2) Place around 50mg wet weight of plant tissue into each tube.
- 3) Add a second 4mm stainless steel grinding ball, on each sample, into each tube.
- 4) Store samples at -80°C until DNA isolation.

### Prepare CTAB lysis buffer

Depending on plant tissue use, composition of lysis buffer varies.

#### 1.4 M NaCl: DNA isolation from leaves

Products	Initial concentration	250 ml of lysis buffer	1 litre of lysis buffer	Final concentration
CTAB	-	5 g	20 g	2%
EDTA (pH8)	0.5 M	10 ml	40 ml	0.02 M
Tris HCl (pH8)	1 M	25 ml	100 ml	0.1 M
NaCl (solution)	5 M	70 ml	280 ml	1.4 M
NaCl (powder)	-	20.5g	81.8 g	
PVP soluble	-	2.5 g	10 g	1%
H <sub>2</sub> O d	-	qsp	qsp	-

#### 2.5 M NaCl: DNA isolation from nuts

Products	Initial concentration	250 ml of lysis buffer	1 litre of lysis buffer	Final concentration
CTAB	-	5 g	20 g	2%
EDTA (pH8)	0.5 M	10 ml	40 ml	0.02 M
Tris HCl (pH8)	1 M	25 ml	100 ml	0.1 M
NaCl (solution)	5 M	150 ml	600 ml	2.5 M
NaCl (powder)	-	36.5 g	146.1 g	
PVP soluble	-	2.5 g	10 g	1%
H <sub>2</sub> O d	-	qsp	qsp	-

CTAB lysis buffer is stored at room temperature.

### Prepare lysis mix

To isolate DNA form 192 samples (2 plates), mix:

- 80ml of CTAB lysis buffer
- 160µl of β-mercaptoethanol
- 1 ml of Proteinse K (20mg/ml)
- 400µl of RNase A

## Procedure

### Grinding

- 1) placing the two racks in liquid nitrogen.
- 2) Grind samples for 1min at 1500rpm with a grinder Geno / Grinder, and refreeze samples in liquid nitrogen.
- 3) Repeat step 2 until samples are reduced to a fine powder, usually 2 cycles for leaves and up to 5 cycles for chestnuts

### Cells lysis

- 4) Add a spatula tip of PVPP to each sample.
- 5) Preheat extraction buffer at 65°C.
- 6) Add 400µl of lysis mix to each sample, and mix vigorously.
- 7) Incubate 1h on benchtop incubated orbital shaker at 65°C. During the lysis, mix several times by inverting plates to resuspend the powder from grinded tissue.
- 8) Incubate 10min on ice.

### DNA isolation

- 9) Add 300µl Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) to each sample. Mix vigorously by inverting plates.
- 10) Centrifuge at 6200rpm, for 20min at 4°C.
- 11) Pipet the supernatant, and transfer it into a 1.2ml tube of a new 96 plate.
- 12) Add 300µl Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) to each sample. Mix vigorously by inverting plates.
- 13) Centrifuge at 6200rpm, for 20min at 4°C.
- 14) Pipet the supernatant, and transfer it into a 1.2ml tube of a new 96 plate.

### DNA precipitation

- 15) Add 200µL of NaCl 5M stored at 4°C.
- 16) Add 500µL of cold Isopropanol stored at -20°C. Mix gently by inverting plates.
- 17) Store at least 1h at -20°C (or 20min et -80°C)
- 18) Centrifuge at 6200rpm, for 30min at 4°C.
- 19) Discard the supernatant

### DNA washing

- 20) Add 400µL of 70% Ethanol stored at -20°C. Mix by inverting plates.
- 21) Centrifuge at 6200rpm, for 30min at 4°C.
- 22) Discard the supernatant
- 23) Add 500µL of Absolute Ethanol stored at -20°C. Mix by inserting plates.
- 24) Centrifuge at 6200rpm, for 30min at 4°C.
- 25) Discard the supernatant.

### DNA drying and resuspension

- 26) Air-dry the pellet one night at room temperature to remove residual ethanol.
- 27) Resuspend the pellet in 100µl in ultra-pure milliQ H<sub>2</sub>O.
- 28) Allow DNA to resuspend 1 day at 4°C.

## Supplementary 2: MISMATCHFINDER, what is it? and how does it work?

Null alleles are common technical artifacts in genetic analyses using codominant markers such as SNPs and SSRs, and can be defined as an allele that consistently fails to amplify during PCR using a given pair of primers (Dakin and Avise 2004; Girard 2011). If one of the nucleotides of the primer binding site experiences a mutation, the corresponding primer might no longer bind. If so, the marker is no longer co-dominant, the genotype is falsely considered to be homozygous and allelic frequency estimates are erroneous. These markers with null alleles are characterized by apparent non-Mendelian inheritance and homozygotes excess. Detecting null alleles and correcting the genotypes are thus of primary importance.

As PCR primers require a high degree of homology with the target sequence to function, the chance of a successful amplification at a SNP locus across individuals is inversely related with their evolutionary distance (Steinkellner et al. 1997). Hence, null alleles are more likely to be found when the sample includes genotypes from divergent populations or even more so from different species. Regardless of the origin of these alleles, it is important to select suitable criteria to identify them. An important point to consider is that null alleles have typically escaped preliminary steps of screening during marker development and so will tend to have relatively low frequencies. Hence, individuals homozygous for null alleles should be typically rare, in contrast to individuals heterozygous for null alleles. Moreover, an absence of amplification is difficult to interpret, even in replicated experiments. Therefore, the presence of individuals failing to amplify is not a good criterion for proving the existence of null alleles: other criteria should be preferred. One approach is to characterize genetically the progeny of individual plants at the studied loci. When such data are available, two complementary criteria can be used to efficiently identify the presence of null alleles. They will be especially valuable if a large progeny can be investigated.

If a mother plant appears homozygous for a given allele (i.e., only this allele is amplified), all of its offspring should harbor that allele. If some offspring of that plant nevertheless lack the maternal allele, the presence of a null allele is suspected in the mother plant. To confirm this hypothesis, an analysis of the frequencies of the different types of genotypes in the progeny will help, as illustrated in Figure 1: if the parent is heterozygous A0, there should be in its progeny as many a0 genotypes ( $q/2$ ) than Aa genotypes ( $q/2$ ).

		Mother gametes (egg)	
		A	0
		1/2	1/2
Fathers' gametes (pollen pool)	A	AA [A]	0A [A]
	p	p/2	p/2
	a	Aa [Aa]	0a [a]
	q	q/2	q/2
	0	A0 [A]	00 [0]
	r	r/2	r/2

Figure 1: The expected proportions of each possible genotype and each phenotype (marked by []) in the progeny of a mother plant A0.  $[A] = p+r/2$ ;  $[Aa] = q/2$ ;  $[a] = q/2$ ; and  $[0] = r/2$ . Hence  $[Aa]=[a]=q/2$ .

When we studied the INRAE chestnut genetic resources collection, which is composed of three closely related but distinct species, the Japanese chestnut (*C. crenata*), the Chinese chestnut (*C. mollissima*) and the European chestnut (*C. sativa*), as well as their hybrids, we found departures from expected Mendelian segregations and hypothesized that several null alleles could be present. We selected 47 mother trees and genetically characterized 40 fruits per

tree at 79 SNPs. We compared the genotypes of the mother with those of her descendants, using two complementary criteria to identify markers with null alleles. We have developed a software called MISMATCHFINDER to automatically detect null alleles in such situations. This software (i) identifies markers for which the mother is (apparently) homozygous, (ii) checks the progeny for offspring (apparently) homozygous for the opposite allele, and (iii) counts the number of heterozygous offspring and compares it with the number of (apparently) homozygous offspring for the opposite allele. The results are provided in the form of a Table to facilitate interpretations. With such progeny sample sizes, the approach works well when the minor allele frequency at the investigated locus is not too small, thereby providing sufficient power for the analysis.

MISMATCHFINDER is coded in Java, using the Apache POI for treating Excel (as well as Calc) files. Consider the input size to be  $n$ -times  $m$ , with  $n$  the number of individuals, and  $m$  the number of locus. The algorithm proceeds in a linear fashion, comparing siblings' genomes to the mother's genomes. It thus runs in optimal time  $O(nm)$ . Memory usage is bounded by  $O(m)$ . The software is available at: <https://github.com/jschoete/mismatchfinder>. We also provide a test dataset to show how it works.

## References:

- Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93:504–509. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800545>
- Girard P (2011) A robust statistical method to detect null alleles in microsatellite and SNP datasets in both panmictic and inbred populations. *Stat Appl Genet Mol Biol* 10:Article 9. <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1620>
- Steinkellner H, Lexer C, Turetschek E, Glössl J (1997) Conservation of (GA) $n$  microsatellite loci between *Quercus* species. *Mol Ecol* 6:1189–1194. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00288>.

## Supplementary 3: STRUCTURE parameters

We used the same parameters for **STRUCTURE** analysis (Pritchard et al. 2000) with both datasets (68 SNPs and 94 SSRs; Files 3 and 4, Larue 2021). We relied on the default parameters for ancestry model, frequency model and advanced options. For the first **STRUCTURE** analyses, we set K from 2 to 9 and performed 20 iterations per K value. We then selected the best K using the online version of **CLUMPAK** (<http://clumpak.tau.ac.il/bestK.html>) by computing the  $\Delta K$  of Evanno et al. (2005) and  $Pr(X|K)$  of Pritchard et al. (2000). The best results were obtained with K=3, which is consistent with the existing knowledge because the INRAE chestnut germplasm collection is composed of trees belonging to the three chestnut species and their hybrids. For the following analyses, the K parameter has been set at 3, and we performed 20 iterations.

### Parameters set:

#### Running Length

Length of Burnin Period: 300000  
Number of MCMC Reps after Burnin: 150000

#### Ancestry Model Info

Use Admixture Model  
\* Infer Alpha  
\* Initial Value of ALPHA (Dirichlet Parameter for Degree of Admixture): 1.0  
\* Use Same Alpha for all Populations  
\* Use a Uniform Prior for Alpha  
\*\* Maximum Value for Alpha: 10.0  
\*\* SD of Proposal for Updating Alpha: 0.025

#### Frequency Model Info

Allele Frequencies are Correlated among Pops  
\* Assume Different Values of Fst for Different Subpopulations  
\* Prior Mean of Fst for Pops: 0.01  
\* Prior SD of Fst for Pops: 0.05  
\* Use Constant Lambda (Allele Frequencies Parameter)  
\* Value of Lambda: 1.0

#### Advanced Options

Estimate the Probability of the Data Under the Model  
Frequency of Metropolis update for Q: 10

### Run parameters:

#### Start Job

Set K from 3 to 3  
Number of Iterations: 20

## References:

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Larue C (2021) Development of SNP markers for the identification of chestnut species, hybrids and varieties. <https://doi.org/10.15454/X>
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959

## Supplementary 4: Probability of identity and probability of exclusion for chestnut species based on 68 SNPs versus 94 SSRs

Populations	N	PI <sup>1</sup>		PI sibs <sup>2</sup>		P2 <sup>3</sup>	
		SNPs	SSRs	SNPs	SSRs	SNPs	SSRs
<i>C. crenata</i>	7	$7 \cdot 10^{-10}$	$5 \cdot 10^{-46}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$9 \cdot 10^{-21}$	0.90	0.9999998
<i>C. mollissima</i>	17	$3 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-54}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-24}$	0.85	0.999999996
<i>C. sativa</i>	40	$1 \cdot 10^{-15}$	$6 \cdot 10^{-50}$	$2 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-22}$	0.97	0.99999997
<i>C. sativa</i> x <i>C. crenata</i> hybrids	17	$9 \cdot 10^{-20}$	$4 \cdot 10^{-73}$	$2 \cdot 10^{-10}$	$7 \cdot 10^{-31}$	0.99	1

<sup>1</sup>Probability of Identity (PI) provides an estimate of the average probability that two unrelated individuals drawn from the same population will have the same multilocus genotype.

<sup>2</sup>Probability of Identity with Siblings (PI sibs) provides an estimate of the average probability that two related individuals drawn from the same population will have the same multilocus genotype.

<sup>3</sup>Probability of exclusion when only the mother is known (P2) is the probability for excluding a putative father (paternity exclusion) when carrying out paternity analysis.

## Supplementary 5 : Fréquences alléliques des SSR chloroplastiques par espèce et identification des allèles fixés

Locus	Alleles	<i>C. sativa</i>	<i>C. crenata</i>	<i>C. mollissima</i>	Hybrides CS	Locus	Alleles	<i>C. sativa</i>	<i>C. crenata</i>	<i>C. mollissima</i>	Hybrides CS
cS_4	101	1	-	-	0,524	cS_36	101	0,951	-	-	0,524
	102	-	-	0,882	-		102	-	1	-	0,476
	103	-	1	-	0,476		103	-	-	1	-
	104	-	-	0,118	-		104	0,049	-	-	-
cS_8	101	-	-	0,118	-	cS_38a	101	0,951	1	1	1
	102	0,951	-	-	0,524		102	0,049	-	-	-
	103	0,049	-	0,882	-	cS_38b	101	-	1	-	0,476
	104	-	1	-	0,476		102	0,951	-	-	0,524
cS_15	101	0,049	-	-	-	103	-	-	-	0,118	-
	102	0,951	-	-	0,524	104	-	-	-	0,882	-
	103	-	-	0,882	-	105	0,049	-	-	-	-
	104	-	-	0,118	-	cS_39	101	-	0,571	-	-
	105	-	1	-	0,476		102	0,049	-	0,118	-
cS_17	101	1	1	-	0,882	cS_40	103	-	0,429	-	0,476
	102	-	-	0,118	-		104	0,951	-	-	0,524
cS_18	101	0,049	-	-	-	105	-	-	-	0,882	-
	102	-	-	0,118	-	cS_40	101	-	1	-	0,476
	103	-	-	0,882	-		102	0,049	-	-	-
	104	0,951	-	-	0,524		103	0,951	-	-	0,524
	105	-	1	-	0,476	104	-	-	-	0,882	-
cS_20	101	0,951	-	-	0,524	105	-	-	-	0,118	-
	102	-	1	0,118	0,476	cS_41	101	0,951	-	-	0,733
	103	0,049	-	-	-		102	-	-	0,882	-
	104	-	-	0,882	-		103	0,049	-	-	-
cS_21a	101	-	-	0,882	-	104	-	-	-	0,118	-
	102	-	-	0,118	-	105	-	-	-	0,267	-
	103	-	1	-	0,476	cS_47	101	-	-	0,118	-
	104	1	-	-	0,524		102	-	-	0,882	-
cS_21b	101	1	1	-	-	cS_47	103	0,951	-	-	0,524
	102	-	-	0,882	-		104	0,049	-	-	-
	103	-	-	0,118	-		105	-	1	-	0,476
cS_25	101	-	1	-	-	106	-	-	-	-	0,524
	102	0,049	-	-	-	cS_48	101	0,951	-	-	-
	103	0,951	-	-	0,55		102	-	-	0,118	-
	104	-	-	0,118	-		103	-	1	-	0,429
	105	-	-	0,882	-	104	-	-	-	0,882	-
cS_27	101	0,049	-	-	-	105	-	-	-	-	-
	102	0,951	-	0,882	0,524	cS_50	101	-	-	0,118	-
	103	-	-	0,118	-		102	0,951	-	-	0,571
	104	-	1	-	0,476		103	0,049	1	0,882	0,429
cS_28a	101	-	-	0,118	-	cS_51a	101	0,951	-	0,118	0,524
	102	-	-	0,882	-		102	-	1	-	0,476
	103	-	1	-	0,476	cS_51a	103	0,049	-	-	-
	104	0,049	-	-	-		104	-	-	0,176	-
cS_28a	105	0,951	-	-	0,524	cS_51a	105	-	-	0,706	-

Locus	Alleles	<i>C. sativa</i>	<i>C. crenata</i>	<i>C. mollissima</i>	Hybrides CS	Locus	Alleles	<i>C. sativa</i>	<i>C. crenata</i>	<i>C. mollissima</i>	Hybrides CS
cS_28b	101	-	1	-	0,476	cS_51b	101	0,951	-	-	0,524
	102	0,049	-	-	-		102	-	1	0,882	0,476
	103	-	-	0,882	-		103	0,049	-	0,118	-
	104	-	-	0,118	-		101	0,951	-	-	0,524
	105	0,951	-	-	0,524		102	0,049	-	1	-
cS_28c	101	-	-	0,118	-	cS_52	103	-	1	-	0,476
	102	-	-	0,882	-		101	-	-	0,882	-
	103	0,951	-	-	0,524		102	-	-	0,118	-
	104	-	1	-	0,476		103	1	-	-	0,524
	105	0,049	-	-	-		104	-	1	-	0,476
cS_33a	101	0,951	-	-	0,524	cS_53	101	-	1	-	0,476
	102	0,049	-	-	-		102	1	-	0,118	0,524
	103	-	-	0,118	-		103	-	-	0,882	-
	104	-	-	0,882	-		101	-	1	-	0,476
	105	-	1	-	0,476		102	0,951	-	-	0,524
cS_33b	101	-	-	0,118	-	cS_54a	103	0,049	-	0,25	-
	102	0,049	-	-	-		104	-	-	0,5	-
	103	-	1	-	0,476		105	-	-	0,25	-
	104	0,951	-	-	0,524		101	-	-	0,118	-
	105	-	-	0,882	-		102	-	-	0,882	-
						cS_54b	103	-	1	-	0,476
							104	1	-	-	0,524

